

**Chromosomale Aberrationen  
der frühen zervikalen Karzinogenese**

**Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum  
naturalium (Dr. rer. nat.)**

**vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller- Universität Jena**

**von Diplom-Biologin Birgit Meyer**

**geboren am 13.12.1975 in Cuxhaven**

**Gutachter:**

Prof. Uwe Claussen

Prof. Matthias Dürst

PD Reiner Siebert

Tag des Rigorums: 27. März 2006

Tag der öffentlichen Verteidigung: 15. Mai 2006

Überarbeitete Version vom 15. September 2006

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	1
Abbildungsverzeichnis.....	3
Zusammenfassung .....	4
1 Einleitung.....	6
1.1 Tumorgenese.....	6
1.1.1 Allgemein.....	6
1.1.2 Die virale Tumorgenese .....	7
1.1.3 HPV und das Zervixkarzinom.....	8
1.2 Diagnostik und Stadien .....	10
1.2.1 Das Zellkulturmodell und seine Aussagen.....	12
1.3 Methoden der molekularen Zytogenetik .....	13
1.3.1 Spektrale Karyotypisierung (SKY).....	14
1.4 Ziel dieser Arbeit .....	17
2 Material und Methoden.....	19
2.1 Material.....	19
2.1.1 Chemikalien .....	19
2.1.2 Geräte.....	22
2.1.3 Verwendete Gewebe und Zelllinien.....	22
2.1.4 Hefestämme .....	24
2.1.5 Sonstiges Material.....	24
2.2 Methoden .....	25
2.2.1 Herstellung FAD-Medium .....	25
2.2.2 Einfriermedium/ Einfrieren von Zellen.....	26
2.2.3 Auftauen von Zellen aus flüssigem Stickstoff .....	26
2.2.4 Isolierung humaner Epidermiszellen aus Vorhäuten.....	27
2.2.5 Herstellung einer 3T3-Feeder-Zell-Kultur .....	28
2.2.6 Isolierung humaner Keratinozyten aus Tumorgewebe.....	28
2.2.7 Splitten der Keratinozyten: (Entfernen der Fibroblasten) .....	28
2.2.8 Chromosomenaufarbeitung aus Zellen, in Monolayer wachsend .....	29
2.2.9 Gewinnung von Premature condensed chromosomes (PCC) mit Calyculin A aus Zellen in Kultur .....	30
2.2.10 SKY-FISH (Spectral karyotyping).....	32
2.2.10.1 Vorbehandlung der Objektträger.....	32
2.2.10.2 Sonden-Präzipitation und Hybridisierung .....	34
2.2.10.3 Detektion.....	35
2.2.10.4 Aufnahme.....	37
2.2.10.5 Auswertung und Dokumentation .....	37
2.2.11 Chromosomenpräparation aus Blutlymphozyten .....	37
2.2.12 Interphasen-FISH .....	39
2.2.12.1 Herstellung der Sonden.....	39

2.2.12.1.1	Kultur der Hefestämme.....	39
2.2.12.1.2	Stammkulturen.....	40
2.2.12.1.3	DNA-Extraktion .....	40
2.2.12.1.4	Polymerase chain reaction zur Amplifikation der Hefe-DNA .....	41
2.2.12.2	Gelelektrophorese von PCR-Amplifikaten: .....	42
2.2.12.3	Verkürzen der markierten DNA.....	44
2.2.12.4	Fluoreszenz in-situ Hybridisierung .....	44
2.2.12.4.1	FISH an Chromosomenpräparaten aus Lymphozyten: Sondentest.....	44
2.2.12.4.2	Herstellen und Vorbehandlung der Schnitte .....	45
2.2.12.4.3	FISH mit einer kommerziellen Zentromersonde .....	46
2.2.12.4.4	Interphasen-FISH mit Sonden aus künstlichen Hefechromosomen.....	47
3	Ergebnisse.....	49
3.1	Zellkultur: Gewinnung von Metaphase-Chromosomen .....	49
3.2	Direktpräparation des Gewebes .....	49
3.3	Kurz- und Langzeitkultur der Gewebe.....	50
3.3.1	Calyculin A .....	50
3.4	SKY-FISH .....	51
3.4.1	Ploidiegrade in den untersuchten Zellen .....	52
3.4.2	Ergebnisse Keratinozyten .....	53
3.4.3	Ergebnisse HPK-Zellen allgemein .....	56
3.4.3.1	HPKIA-2 .....	56
3.4.3.2	HPKII-2 .....	62
3.4.3.3	HPKIII-2 .....	66
3.4.3.4	HPKV-2 .....	69
3.4.3.5	Zusammenfassung: Ergebnisse aller HPK-Zelllinien .....	72
3.4.4	Ergebnisse primärer Kulturen .....	73
3.4.4.1	Zellkultur 1 (19/03).....	74
3.4.4.2	Zellkultur 2 (pt238KE).....	76
3.5	Interphasen-FISH.....	78
4	Diskussion.....	84
5	Literatur .....	I
6	Wichtige Abkürzungen .....	X
7	Danksagung .....	XII

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1 : Fluoreszenz in-situ Hybridisierung. ....	13
Abbildung 1-2 Schematische Darstellung: Aufbau des Spectracubes .....	16
Abbildung 2-1 Die Lokalisationen der verwendeten Sonden, schematisch dargestellt .....	24
Abbildung 2-2 Markierungsschema für die SKY-Sonden .....	32
Abbildung 3-1 Metaphase aus einer Direktpräparation .....	50
Abbildung 3-2 Metaphase aus einer Kurzzeitkultur .....	51
Abbildung 3-3: SKY an normalen Keratinozyten.....	54
Abbildung 3-4 Beispiel für je eine Metaphase aus normalen Keratinozyten und HPKIA-2.....	57
Abbildung 3-5 Verluste und Zugewinne in der Zelllinie HPKIA-2 mit fortschreitender Passagierung im Vergleich zu primären Keratinozyten .....	61
Abbildung 3-6 Verluste und Zugewinne in der Zelllinie HPKII-2 in fortschreitender Passagierung im Vergleich zu primären Keratinozyten .....	64
Abbildung 3-7 SKY-Karyogramm aus HPKII-2 p17 und HPKIII-2 p44 .....	65
Abbildung 3-8 Verluste und Zugewinne in der Zelllinie HPKIII-2 in fortschreitender Passagierung im Vergleich zu primären Keratinozyten .....	69
Abbildung 3-9 Beispiel für triradiale Chromosomen.....	72
Abbildung 3-10 Metaphase aus dem Tumor 19/03.....	73
Abbildung 3-11 Numerische Aberrationen in einer primären Zellkultur aus Zervixkarzinomen .....	74
Abbildung 3-12 Karyogramme aus den Zelllinien HPKII-2 (links) und HPKV-2 (rechts) .....	78
Abbildung 3-13 Sonden 751d05 und 927g05-- Test an Blutpräparaten .....	79
Abbildung 3-14 Durchschnittliche Verteilung der Signale in Normalgewebe. ....	80
Abbildung 3-15 Beispiel für eine Interphasen-FISH mit der Zentromersonde an einem Schnitt: normales Gewebe und CIN .....	81
Abbildung 3-16 Ergebnisse der Interphasen-FISH für den Tumor Nr. 8.....	82
Abbildung 4-1 Modell der Progression des Epithels zum Tumor (aus Wentzensen et al., 2004).....	84

## Zusammenfassung

Ein Zervixkarzinom entsteht in der Regel aus zervikalen intraepithelialen Neoplasien (CIN). Sowohl der Differenzierungsgrad des Epithels sowie das Vorkommen atypischer Mitosefiguren werden zur histologischen Einstufung der Präkanzerosen der Cervix uteri benutzt.

Eine persistierende Infektion mit „high risk“ humanen Papillomaviren (hr-HPV) wird als notwendige Ursache für die Entstehung eines Zervixkarzinoms angesehen. Durch die Expression der viralen Onkogene E6 und E7, welche mit p53 bzw. pRB interagieren, kommt es zu einer deregulierten Proliferation und genetischen Instabilität der Zelle. Die Progression einer HPV-infizierten Zelle zu einem malignen Phänotyp erfordert weitere genetische Veränderungen des Wirtszellgenoms. Mit dem Auftreten von chromosomalen Aberrationen kann es zur Mutation oder dem Verlust von Tumorsuppressorgenen und zur Aktivierung und Amplifikation von Onkogenen kommen, die im Prozeß der Tumorgenese involviert sind.

Bislang gibt es kaum verlässliche genetische Marker, durch die das progressive Potential einer Neoplasie eingeschätzt werden könnte.

Zur Untersuchung genetischer Veränderungen in immortalen Zellen verwenden wir ein in-vitro Zellkulturmodell bestehend aus mehreren voneinander unabhängig etablierten HPV-16 oder HPV-18-positiven HPK-Zelllinien (humane Papillomavirus immortalisierte Keratinozyten: HPK IA, II, III und V). Diese primären Zellkulturen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Transfektion des Virusgenoms mittels vergleichender genomischer Hybridisierung (CGH) auf genetische Veränderungen hin untersucht (Solinas-Toldo et al., 1997). Im Ergebnis der CGH-Analysen fanden sich charakteristische chromosomale Zugewinne und Verluste.

In der vorliegenden Studie sollten analog dazu die frühen Passagen der HPK-Zelllinien sowie auch primäre Kulturen aus CIN und zervikalen Karzinomen mittels spectral karyotyping (SKY) auf charakteristische zytogenetische Veränderungen untersucht werden. Diese könnten, nach der Bestätigung ihrer Bedeutung für die Karzinogenese, als diagnostischer Marker Verwendung finden.

Die HPK-Zelllinien wurden in mindestens zwei Passagen untersucht. Um einen Überblick über Zellkultur-bedingte Aberrationen wurden als Kontrolle primäre Keratinozyten aus der Vorhaut verwendet.

Die Verluste der Chromosomen 4 und 10p, die in der CGH-Studie nachgewiesen worden waren, konnten in den Zelllinien bestätigt werden. Zudem konnte im Fall von 10p auch die für den Verlust ursächlichen Translokationen gefunden werden. In den vier Linien sind diese jedoch unterschiedlicher Art: In HPKIA ist es ein deletiertes Chromosom, in HPKII eine t(10;14), in HPKV eine t(5;10). In HPKII ist das gesamte Chromosom 10 unterrepräsentiert. Der Verlust von Chromosom 10p wurde mittels Interphasen-FISH an Schnitten paraffineingebetteter Zervixkarzinome untersucht. Auch hier konnte eine häufige Unterrepräsentation dieses Bereiches bestätigt werden.

Weitere Aberrationen sind die Verluste der Chromosomen 6 (3/4 Zelllinien), 12 (in 2 Verlust des gesamten Chromosoms, in 2 weiteren in einer Translokation) und 18 (2 mal der Verlust des gesamten Chromosoms, einmal verkürzt). Die Chromosomen 9 (2/4), 11 (2/4, einmal in Translokation unter Duplikation von Chromosom 11-Bereichen einbezogen), und 20 (3/4) liegen in höherer Kopienzahl vor. Das Chromosom 5 weist die meisten Brüche auf, viele davon haben Translokationen zur Folge. Das Chromosom 8 ist ebenfalls in drei der Zelllinien von Veränderungen betroffen: In HPKII liegt es als der(8)i(8q) vor, in HPKIII und HPKV gibt es eine erhöhte Kopienzahl des gesamten Chromosom 8.

Die Anzahl dieser Marker erhöhte sich mit der steigenden Passagierung.

In den HPK-Zelllinien wurde eine große Zahl hoch-polyploider Zellen festgestellt. Mit steigender Passagierung ging dieses Phänomen jedoch zurück. Es kann daraus geschlossen werden, dass Polyploidie einen Wachstumsnachteil darstellt.

Die primäre Kultivierung von Zellen aus CIN war nicht erfolgreich. Auch Zellen aus Tumoren konnten nur unter großen Schwierigkeiten in ausreichender Zahl zur Mitose geführt werden. Lediglich zwei primäre Tumore konnten aus diesem Grund mittels SKY untersucht werden. Diese Zellkulturen wiesen auch einige Aberrationen auf, die in den HPK-Zelllinien gefunden wurden. Hierzu gehören die Deletion von Chromosom 4, das Zerschneiden des Chromosom 5 und die Deletion des Chromosom 18. Auch findet sich in einer der Zellkulturen eine erhöhte Kopienzahl des Chromosoms 8. Eine dieser primären Zellkulturen wies etwa zur Hälfte tetraploide Metaphasen auf.

In Fortsetzung des Projektes wird die Detektion weiterer Veränderungen mittels Interphasen-FISH in Geweben durchgeführt werden. Zudem sollte eine funktionelle Eingrenzung der Bereiche erfolgen.

# 1 Einleitung

## 1.1 Tumorgenese

### 1.1.1 Allgemein

Die Tumorgenese wird durch ein erstes, notwendiges Ereignis eingeleitet. In Fällen erblich bedingter Tumore sind entscheidende Veränderungen bereits von Geburt an vorhanden, dazu gehören z.B. die Vererbung des mutierten pRB-Gens, dessen verändertes Genprodukt bereits bei Säuglingen ein Retinoblastom auslösen kann. Da diese Mutation meist nur von einem Elternteil vererbt wird, muß für die Tumorentwicklung das Genprodukt des Allels des anderen Elternteils auch in seiner Funktion gestört oder inaktiviert werden (Two Hit Model nach Knudson, 1971).

Andere essentielle Veränderungen können durch mutagene Agenzien chemischer, physikalischer oder biologischer Art verursacht sein (Hennig, S. 245ff., Ausgabe von 1995). Dazu gehören z.B. durch die Nahrung aufgenommene Verbindungen wie z.B. Benzopyren, lang andauernde UV-Einstrahlung oder die toxischen Metabolite, die von Schimmelpilzen abgesondert werden. Manche Tumorarten werden durch eine Virusinfektion initiiert (s.u.).

Alle diese Ereignisse müssen aber keine Tumorausbildung zur Folge haben, sie sind notwendig, jedoch nicht ausreichend für die Tumorgenese.

Nach Fearon und Vogelstein (Fearon und Vogelstein, 1990) sind folgende Ereignisse essentiell für die Tumorgenese (das so genannte „Vogelstein-Modell“):

- Die mutationsbedingte Aktivierung von (Proto-)Onkogenen ist gekoppelt mit der mutationsbedingten Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen.
- Mutationen in wenigstens 4 bis 5 Genen führen zur Formation eines malignen Tumors. Wenige Mutationen reichen aus für benigne Tumore. Hierbei sind eine oder zwei Mutationen (z.B. 17p und 18q betreffend, d.h. die Gene des p53 und DCC („deleted in colon cancer“) sowie möglicherweise SMAD-4 (früher „deleted in pancreatic cancer“ kurz: DPC in Colonkarzinomen)) in allen Tumoren nachweisbar. Die übrigen Verluste oder Überrepräsentationen sind heterogen. Es ist nicht bekannt, ob die folgenden Aberrationen zufällig durch Segregationsfehler im Zellzyklus entstehen und einen Selektionsvorteil bieten, oder jedes Chromosom ein



oder mehrere Tumorsuppressorgene enthält, deren Verlust oder Deaktivierung die Progression zum Tumor vorantreibt.

- Die progressive Akkumulation genetischer Veränderungen scheint wichtiger als die Reihenfolge der einzelnen Veränderungen. Es sind jedoch bestimmte Muster häufig. Beispielsweise ist die Deletion von 5q (Gen-Locus Adenopolyposis coli, kurz APC) die häufigste erste Veränderung in Colon-Adenomen, gefolgt von einer Mutation des Onkogens k-ras und Verlust eines intakten DCC (oder DPC)-Lokus und p53-Mutation. Diese Schritte im Multi-Schritt-Prozess der Karzinogenese bedeuten für die Läsion jeweils Initiation, Promotion und Progression. Je mehr Veränderungen vorliegen desto größer ist die Läsion.
- Ein phänotypischer Effekt prägt sich bereits im heterozygoten Genotyp einer Genmutation aus, d.h. die Mutation ist dominant negativ. So ist in Colonkarzinomen nur eines der beiden p53-Allele mutiert oder deletiert. Ein Wildtyp-Allel wird weiter exprimiert und liefert ein funktionsfähiges Protein. Möglich sind Aktivierungen von Onkogenen oder Deaktivierungen des Wildtyp-Proteins durch das mutierte Genprodukt.
- Andere somatische Veränderungen sind epigenetische Modifikationen wie Demethylierungen, Hypermethylierungen oder Veränderungen des Expressionsniveaus von Tumorsuppressorgenen (z.B. die Hypermethylierung des Promoters des pRB-Gens beim Retinoblastom) welche die Proliferationsstärke einer Zelle beeinflussen (Fearon und Vogelstein 1990, Herman, 1999).

### *1.1.2 Die virale Tumorgenese*

Die Infektion mit Viren unterschiedlichster Arten kann auch die Entwicklung eines Tumors zur Folge haben. Zu diesen Viren gehören (Butel, 2000):

1. Retroviren, die in ihrem Genom neben viralen Genen auch Gene mitbringen, die Proto-Onkogenen des Wirtes sehr ähnlich sind. Es sind keine Retroviren bekannt, die auf diese Art Tumore im Menschen auslösen. Retroviren können als Provirus im Wirtsgenom vorliegen. Sie erlangen ihre onkogene Wirkung durch das „versehentliche“ Verpacken von so genannten Proto-Onkogenen des Wirtsgenoms, die vor dem Provirus liegen. Werden die viralen Gene dann in der Wirtszelle des nächsten Organismus exprimiert, so hat diese Expression häufig auch die Expression des Onkogens zur Folge. Es kann sich, bedingt durch Mutationen, die

während der Infektionen und der Transkription und Replikationen der Nukleinsäuren auftreten können, zum Onkogen entwickeln.

2. Durch Viren, die in das Genom inserieren. Hierzu zählen zumeist ebenfalls Retroviren. Durch diese provirale insertionelle Mutagenese wird das Virusgenom einem Proto-Onkogen vorgeschaltet, so dass dieses dank der Expression viraler Gene ebenfalls exprimiert wird. Proto-Onkogene sind in der ruhenden Zelle schwach oder nicht exprimiert. Neben dem Humanen T-Zell-Leukämie-Virus sind keine Retroviren bekannt, die im Menschen eine Rolle für die Ausbildung von Tumoren spielen.
3. Viren, deren Proteine in den Zellzyklus eingreifen, indem sie die zellulären Tumorsuppressoren p53 und pRB binden und inhibieren. Hierzu gehören die Papillomaviren oder das Hepatitis-B-Virus.

### *1.1.3 HPV und das Zervixkarzinom*

Humane Papillomaviren (HPV) sind kleine Viren, die zur Familie der Papillomaviridae gehören (de Villiers et al., 2004). Ihr Genom besteht aus doppelsträngiger DNA und ist 8kb groß. Sie infizieren vorrangig Epithelien, z.B. der Haut oder der Schleimhäute. HPV sind unterteilt in so genannte „high risk“ und „low-risk“-Typen. Die Typen besitzen unterschiedliche onkogene Potentiale, Tumore auszulösen. Zur „low risk“-Gruppe gehören z.B. die Typen 6 und 11, zur „high risk“-Gruppe z.B. die Typen 16, 18, 33, 45 usw. (Canavan und Doshi, 2000). Die Reihenfolge der Nennung bezeichnet auch die Reihenfolge der Häufigkeit ihres Auftretens im Zervixkarzinom: HPV 16 wird am häufigsten in Zervixkarzinomen gefunden, meistens in Plattenepithelkarzinomen. HPV 18 infizieren meist das Drüsengewebe und verursachen so Adenokarzinome, die Anlaß zu einer schlechteren Prognose geben und aggressiver sind als Plattenepithelkarzinome. Rao und Kollegen (2004) beobachteten in einer CGH-Studie eine leicht höhere genomische Instabilität HPV 18-positiver Zervixkarzinome, konnten aber allgemein keinen Zusammenhang zwischen dem Grad der genomischen Instabilität und der Überlebensrate feststellen.

Nach dem Mammakarzinom ist das Zervixkarzinom die Tumorart bei Frauen mit der weltweit zweitgrößten Inzidenz. Die Zahl der invasiven Tumore konnte nach Einführung des Papanicolaou-Abstriches in den 60er und 70er Jahren von 32 Fällen pro 100.000 auf 12 Fälle pro 100.000 reduziert werden (Globocan, 2005, nachgelesen in

Parkin et al., 2005). Weltweit erkrankten im Jahr 2002 mehr als 493.000 Frauen am Zervixkarzinom (Parkin et al., 2005), knapp 274.000 starben 2002 daran.

Die Zahl der jährlichen Neuerkrankungen in Deutschland wird auf 5800 geschätzt, das ist ein Anteil von 3,4% an allen Krebserkrankungen (aktuelle Statistik des Robert Koch Institutes). Im EU-Vergleich hat Deutschland nach Dänemark die zweithöchste Neuerkrankungsrate. Die niedrigste Rate hat Finnland. Betrachtet man die Altersinzidenz, so fällt auf, dass sie bei Frauen im Alter von 25-35 Jahren deutlich höher ist als bei Frauen über 65 Jahre. Damit ist das Zervixkarzinom eine Krebserkrankung mit einem relativ niedrigen mittlerem Erkrankungsalter (52 Jahre).

Die 5-Jahres-Überlebensrate hat sich während der letzten Jahre kaum verändert und liegt bei 65% (aktuelle Statistik des Robert Koch Institutes, 2005).

Die HPV-Übertragung erfolgt sexuell und ist das wesentliche primäre Ereignis in der zervikalen Karzinogenese, das allein jedoch nicht zur Tumorbildung ausreicht.

Männer erkranken weitaus seltener an der Infektion, die sie übertragen. Jedoch haben Bleeker et al. (2005) Sexualpartner von Patientinnen mit CIN auf Penisläsionen und HPV-Status untersucht und eine im Vergleich zur Kontrollgruppe höhere Rate von Läsionen (60% bzw. 14% in der Kontrollgruppe) und HPV-Positivität (59,4% bzw. 25%) festgestellt. Gegenüber der Kontrollgruppe sind die Läsionen und die Virusmenge größer. Die virale Belastung der Männer ist geringer als die der Frauen, weswegen damit zu rechnen ist, dass es viele falsch-negative Fälle in beiden Gruppen gibt. Jedoch beschreibt auch diese Veröffentlichung nicht die Häufigkeit von HPV-assoziierten Tumorerkrankungen des Mannes.

HPV hat eine zellschädigende Wirkung auf terminal differenzierende Zellen und verursacht koilozytische Atypia (Crum, 2000). Zum Anderen verändert es die Wachstums-Charakteristika und Differenzierung des Epitheliums (Crum, 2000).

Als molekulare Ursachen hierfür sind die viralen Onkoproteine E6 und E7 zu sehen. Dies sind Zinkfingerproteine, welche zur Transformation der Zelle beitragen. Sie binden an entscheidende, den Zellzyklus kontrollierende Proteine, p53 und pRB (Huibregtse und Scheffner, 1994). Damit geht die Inaktivierung oder im Fall des p53 gar der Abbau des Proteins einher (zusammengefaßt in zur Hausen, 2002).

Zusätzlich kann die Integration des Virus-Genoms eine veränderte Expression zellulärer Gene zur Folge haben. Ferber et al. (2004) vermuten aufgrund ihrer Untersuchungen

des HPV 18 Integrationslokus` in HeLa-Zellen beispielsweise eine erhöhte Expression von c-myc, einem Onkogen auf 8q24. Diese zytogenetische Region wird als Integrationsort auch häufig in zervikalen Karzinomen erkannt. In dieser Region befindet sich eine fragile Stelle (fragile site), welche als Grund für das Ereignis vermutet wird. Es wird also auch für das Papillomavirus eine provirale insertielle Mutagenese nicht ausgeschlossen. Die meisten Publikationen weisen auf eine zufällige Insertion hin.

Weitere Risikofaktoren für die Ausbildung eines Zervixkarzinoms sind häufig wechselnde Geschlechtspartner und andere sexuell übertragbare Krankheiten (Schneider et al., 1998). Zudem kann auch ein sozio-ökonomischer Faktor nicht ausgeschlossen werden, so wie auch Rauchen und Fehlernährung (da beide Faktoren das Immunsystem schwächen) das persönliche Risiko zur Progression erhöhen können (Schneider et al., 1998). Ein familiäres Risiko wird trotz des Zusammenhangs mit der Infektion aufgrund des Studiums des schwedischen Krebsregisters belegt (Magnusson et al., 2000). Ferber et al. (2004) unternahmen DNA-Flexibilitätsanalysen der Integrationsstelle von HeLa-Zellen und schließen aus ihren Ergebnissen, dass eine polymorphe Sequenz mit erhöhter Flexibilität (erreichbar durch Punktmutationen, A-->T-Shifts) auch an Stabilität verlieren. Die ererbte Flexibilität trägt dann zu einer höheren Wahrscheinlichkeit der HPV-Integration bei, die das Risiko der Tumorprogression wiederum erhöht, denn in Tumoren und höhergradigen Läsionen ist das virale Genom häufiger in das humane Wirtsgenom integriert (Huibregtse und Scheffner, 1994). Auch andere genetische Eigenschaften sind sicher an einer familiären Gefährdung beteiligt, wie auch die Genetik des Immunsystems.

## **1.2 Diagnostik und Stadien**

Die meisten Patientinnen entwickeln ein Zervixkarzinom erst nach einer langen asymptomatischen Periode, welche es ermöglicht, zunächst harmlosere zytologische Veränderungen durch regelmäßige Kontrollen zu beobachten und damit ein Fortschreiten vom präinvasiven zum invasiven Stadium zu verhindern.

Als Vorstufen zum Karzinom sind zervikale intraepitheliale Neoplasien (CIN) I-III definiert, die ohne Behandlung spontan regredieren, persistieren oder zu invasiven Tumoren progredieren können. Nach Östör (1993) ergeben verschiedene Studien, dass die Wahrscheinlichkeit einer CIN I zu regredieren bei 60% liegt, zur Persistenz bei 30% und zur Progression zur CIN III bei 10%. Die Wahrscheinlichkeit zur Invasion zum Karzinom beträgt 1%. Die Wahrscheinlichkeit, dass eine CIN III zum Karzinom

progrediert beträgt nach derselben Zusammenfassung zahlreicher Studien mehr als 12%, die Wahrscheinlichkeit der Regression 33% (Östör et al., 1993).

Die Diagnostik beschränkt sich heute nicht allein auf den Abstrich und die Zytologie. Ist der Befund des Abstriches auffällig, kann ein HPV-Test Aufschluß darüber geben, ob die Patientin HPV-positiv ist, und wenn ja, mit welchem Typ. Dies sagt jedoch weiterhin nicht viel über ihr Krebsrisiko aus. Eine Kolposkopie mit Anfärbung des Muttermundes mit Essigsäure oder Jod kann über die Präsenz einer prämaligen oder malignen Läsion Aufschluß geben. Zur weiteren Abklärung kann eine Biopsie entnommen werden. Schnitte dieser Biopsie werden mit Hämatoxylin/ Eosin gefärbt, wodurch neoplastische und normale Zellen durch die unterschiedlichen Kern-Plasma-Verhältnisse voneinander unterschieden werden können. Hierdurch kann die Ausbreitung der Veränderung in tiefere Gewebeschichten untersucht werden. Je nach Größe und Tiefe der Dysplasie, Zahl und Lokalisation atypischer Mitosen und der Störung der Differenzierung der Zellen erfolgt die Klassifizierung in leichtgradige (CIN I) und schwergradige Neoplasien (CINII oder III), CIS (Carcinoma in situ) oder als Tumor. Derzeit wird jede höhergradige Läsion entfernt (Canavan et al., 2000).

Zur Vermeidung unnötiger Operationen wären Marker zur Unterscheidung zwischen benignen und malignen Neoplasien erforderlich. Es wird in verschiedenen Arbeitsgruppen nach Markern unterschiedlicher Typen gesucht. Denkbar sind neben Expressionsmarkern auf RNA oder Proteinebene auch chromosomale Marker. Spezifische diagnostische Marker in der HPV-Infektion scheinen die Überexpression von p16 und NET1/C4.8 zu sein. Der Inhibitor cyclinabhängiger Kinasen p16 ist in vielen Tumoren herunterreguliert (Knippers, S. 186f, 7.Auflage 1997). Im Zervixkarzinom jedoch ist er überexprimiert, bedingt durch die Aktivität der viralen Proteine E6 und E7 (Serrano et al., 1997, Klaes et al., 2001, Crum et al., 2003). Für NET1/C4.8 fand sich mittels Immunhistochemie einerseits eine starke Färbung in allen undifferenzierten Zervixkarzinomen andererseits ist die Proteinexpression nur in einem Teil der untersuchten CIN III-Fälle über das gesamte Epithelium zu sehen (Wollscheid et al., 2002).

Chromosomale Marker haben den Vorteil, dass sie in-situ neben normalen Zellen mittels Interphasen-FISH (s.u.) im Abstrich einer Patientin gesucht werden können. Als Zielsequenz dient eine im Laufe der Progression häufig amplifizierte oder deletierte Sequenz. Es kann jede einzelne Zelle untersucht werden. Im Gegensatz dazu wird in der

molekularbiologischen Methodik die DNA oder RNA aus einer Zellsuspension verwendet. Hierbei kann es zu einer Überdeckung des Ergebnisses der Tumorzellen durch normales Gewebe kommen (Heselmeyer-Haddad et al., 2004).

In CINs finden sich häufig Verluste der Chromosomenarme 3p, 6p und 11q. Außerdem zeigen die Chromosomen und Chromosomenarme 3p, 4p, 5, 6, 11q und 17p die häufigsten Verluste in Tumoren (Kersemaekers et al., 1999). Dies deutet darauf hin, dass sich in diesen Regionen Tumorsuppressorgene befinden. Der Verlust von 3p ist ein frühes Ereignis, welches bereits in CINS auftritt (Heselmeyer et al., 1997). Er ist möglicherweise die Konsequenz aus der Überrepräsentation des langen Armes, zum Beispiel durch Bildung eines Isochromosoms.

Die Kenntnis über den Ablauf von Vorgängen in der Onkogenese wurde in Zellkulturmodellen, zytogenetischen und immunohistologischen Untersuchungen gewonnen.

### *1.2.1 Das Zellkulturmodell und seine Aussagen*

Zur Untersuchung genetischer Veränderungen in immortalen Zellen verwenden wir ein in-vitro Zellkulturmodell. Dieses beinhaltet mehrere Zelllinien, die durch voneinander unabhängige Transfektionen primärer Vorhautkeratinozyten mit HPV 16 oder 18 etabliert wurden. Sie erhielten aufgrund ihrer Immortalität die Bezeichnung „human papillomavirus-immortalized keratinozyten“, kurz „HPK“ (Dürst et al., 1995).

Mit fortschreitender Passagierung erwarben die Zellen neben der Immortalität in-vitro einen tumorigenen Phänotyp, der anhand der subkutanen Injektion in athymische Nacktmäuse festzustellen war (Seagon et al., 1994).

Die Zellkulturen wurden in unterschiedlichen Passagen nach Virusinfektion mittels vergleichender genomischer Hybridisierung (CGH) auf genetische Veränderungen untersucht (Solinas-Toldo et al., 1997). In allen vier untersuchten Zelllinien fanden sich Unterrepräsentationen des kurzen Armes des Chromosoms 10 und des gesamten Chromosoms 4. Es wurde vermutet, dass sich auf diesen Chromosomen Gene befinden, die in Zusammenhang mit Immortalität/ Seneszenz stehen.

Weitere häufige chromosomale Aberrationen waren Zugewinne von 3q, 5q, 14q, 22q und Chromosom 16, sowie Verluste von 6q (Solinas-Toldo et al., 1997).

Die funktionelle Bedeutung des Chromosoms 4 und von 10p wurde mittels Mikrozellvermittelten Einzelchromosomentransfer überprüft. Hierfür wurden Donorzellen mit verschiedenen Derivatvchromosomen 4 und 10 etabliert. Im Ergebnis dieser

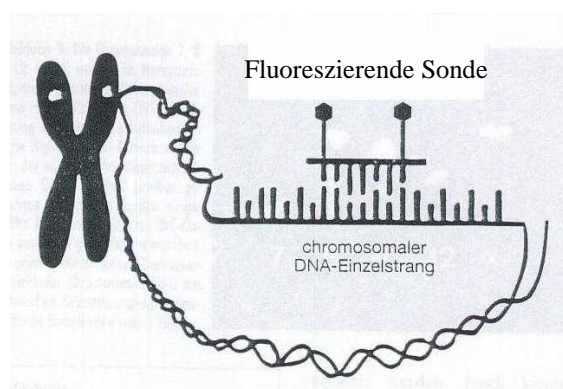
Untersuchungen konnte eine Kartierung möglicher Seneszenzgene auf die Bereiche 4q35.1-->4qter (Backsch et al., 2005) und 10p14-15 (Poignée et al. 2001) erfolgen.

Für beide Regionen konnte an Tumorgeweben auch mittels LOH-Analyse und Interphasen-FISH die klinische Bedeutung bestätigt werden (Poignée et al. 2001, Backsch et al., 2005).

Als Faktor für die Tumorgenese in-vivo wurde bisher das hTR-Gen (in der zitierten Publikation als „TERC-Gen“ bezeichnet), das das RNA-Element der Telomerase kodiert, näher eingegrenzt. Die zytogenetische Region um diese Sequenz (3q26) tritt in Zervixkarzinomen und höhergradigen CINs gehäuft überrepräsentiert auf, was mittels zytogenetischer Methoden nachgewiesen wurde (Heselmeyer-Haddad et al., 2004).

### 1.3 Methoden der molekularen Zytogenetik

Die in-situ-Hybridisierung (ISH) ist eine molekular-zytogenetische Technik, mit der spezifische Sequenzen von Nukleinsäuren (DNA und RNA) direkt in fixierten Präparaten von Geweben, einzelnen Zellen oder subzellulären Komponenten (Chromosomen) lokalisiert werden. Zielsequenzen für die DNA-Sonden können Einzelkopie-Sequenzen oder schwach repetitive Sequenzen, repetitive Sequenzen, einzelne Chromosomen oder virale Sequenzen sein (Schuffenhauer et al., 1997).



**Abbildung 1-1 : Fluoreszenz in-situ Hybridisierung:** Die Sonde bindet direkt auf dem Chromosom, an der ihr komplementären DNA-Sequenz. Durch die Markierung der Sonde mit einem fluoreszierenden Farbstoff (hier dargestellt durch die kurze Sequenz mit den Sechsecken „markiert“) kann dieser Bereich im Fluoreszenz-Mikroskop vor dem Hintergrund des Chromosoms visualisiert werden (nach Schuffenhauer und Murken, 1997)

Die Technik beruht auf der Eigenschaft einzelsträngiger DNA (oder RNA) sich mit komplementären Basensequenzen zu einem Doppelstrang zusammen zu lagern (s. Abbildung 1-1). Werden zur Visualisierung Fluorochrome verwendet, die im

Fluoreszenzmikroskop detektiert werden, spricht man von „Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung“, kurz „FISH“.

Bei der Interphasen-Fluoreszenz-FISH wird die Sonde auf archivierten Geweben oder Zellkernsuspensionen hybridisiert. Am Mikroskop erfolgt die Bestimmung der Signale pro Kern, für mindestens 50 Kerne, besser für bis zu 200 Kerne. Anhand der Verteilungen der Signale pro Kern kann dann ein Verlust oder ein Zugewinn der Region bestimmt werden.

FISH erlaubt die Lokalisation von DNA-Sequenzen in relativ kurzer Zeit und mit hoher Sensitivität und Spezifität. Die Effizienz eines Nachweises hängt von der Anzahl der spezifisch gebundenen Reportermoleküle und den angewendeten Nachweisverfahren ab (direkte oder indirekte Markierung). Auch das Präparat (Schnitt, Kernsuspension oder Chromosomenpräparat) beeinflusst die Sensitivität.

In Gewebeschnitten sind immer ein Teil oder, je nach Schnittdicke, alle Kerne angeschnitten. Dies zieht ein künstliches Entfernen von Zielregionen der Sonde mit sich, die eine hohe Zahl an Kernen mit Signalverlusten zur Folge hat.

Aus diesem Grund muß die Signalverteilung von normalem Gewebe mit der des pathologischen Gewebes verglichen und statistisch auf die Relevanz des Unterschiedes überprüft werden. Für verschiedene Publikationen (z.B. Bulten et al. 1998, Hamon-Benais et al., 1996, Baretton et al., 1998, Zitzelsberger et al, 1994, Perry et al., 1997) wurde hier der Chi-Quadrat-Test durchgeführt.

### *1.3.1 Spektrale Karyotypisierung (SKY)*

Methodisch stehen zur Identifikation unbekannter Bruchpunkte die Multicolour-FISH-Verfahren zur Verfügung. Im Wesentlichen unterscheidet man bei der 24-Farben-FISH zur simultanen Darstellung aller Chromosomen drei Techniken:

- Multiplex-FISH /M-FISH (Speicher et al., 1996)
- Combined binary ratio labelling/ COBRA-FISH (Tanke et al., 1999)
- Spectral karyotyping/ SKY (Schröck et al., 1996 und 2000)

Die 24-Farben-Fluoreszenzen erlauben die Untersuchung des gesamten Chromosomensatz einer Metaphase, was insbesondere in Zellen mit zahlreichen komplexen Rearrangements, die mittels klassischer Bänderungstechniken nicht vollständig erkannt werden können, von Vorteil ist.



Die Vorteile der SKY-FISH liegen in der eindeutigen Identifikation von chromosomalen Aberrationen (vor allem balancierten Translokationen) und komplexen Karyotypen. Durch Kombination der Paints und der Bänderungstechnik (DAPI-Färbung) kann eine genaue Identifikation der chromosomalen Bruchpunkte erfolgen (Veldmon et al., 1997).

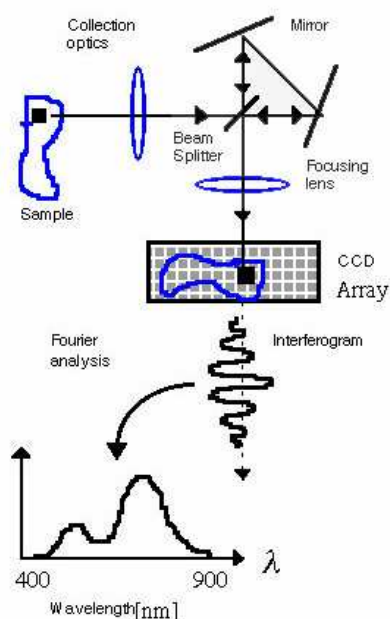
Darüber hinaus gibt es allerdings eine Reihe von Veränderungen, die von Chromosomenpaints nicht sichtbar gemacht werden können: kleine intrachromosomale Rearrangements wie para- und perizentrische Inversionen und kleine Duplikationen. Die Sensitivität der SKY-FISH für die Detektion interchromosomaler Veränderungen liegt bei ca. 1,5 Mb (Schröck et al., 1996). Dies ist abhängig von der Qualität der Metaphasenpräparate.

Die in der Studie zum Einsatz kommende SKY-FISH zeigt die Chromosomen in 24 Farben. Da es nicht so viele für das menschliche Auge gut unterscheidbare Fluorochrome gibt, beruht diese Methode auf der Kombination der fünf Fluorochrome SpectrumGreen, SpectrumOrange, Texas Red, Cy5 und Cy5.5. Durch eine für jedes Chromosom spezifische Kombination von bis zu vier Sonden (siehe Abbildung 2-1, Material und Methoden), die mit einer dieser Farben markiert sind, können individuelle Farben gemischt werden. Jedes Pixel des Bildes wird vom Aufnahmesystem einzeln aufgenommen und gespeichert. Durch eine Fourier-Analyse, also ein Auflösen des erhaltenen Spektrums in die Einzelspektren der Fluorochrome wird für jedes Pixel die Farbmischung und damit die Zuordnung zu den Chromosomen erreicht. Durch dieses Erkennen der Farbkombination sowie durch das Zuordnen von Fehlfarben kann jedes Chromosom und seine Derivate erkannt werden.

Der Aufbau eines Spectracubes wird anhand der Abbildung 1-2 gezeigt.

Verschiedene Publikationen erläutern die SKY-FISH und betonen ihre Aussagekraft für die Beschreibung komplexer Karyotypen (Macville et al., 1997), diskutieren ihre Sensitivität (Fan et al., 2000) und ihre Grenzen (Lee et al., 2001).

### Schematical Optical Diagram



**Abbildung 1-2 Schematische Darstellung: Aufbau des Spectracubes: Das Bild wird in viele Bildabschnitte unterteilt. Jedes Pixel wird einzeln aufgenommen und mittels Fourier-Analyse der Interferogramme werden die farblichen Zusammensetzungen der Bildabschnitte ermittelt. Hierdurch ist eine Zuordnung zu den jeweiligen Chromosomen möglich.**

Bisher erschienene Literatur zeigt hauptsächlich deskriptiv SKY-FISH-ermittelte Daten aus Leukämien (z.B. Inokuchi et al., 2001), aber auch an Zelllinien aus soliden Tumoren wie ovariellen Adenokarzinomen (Rao et al., 2002), hepatozellulären Karzinomen (Pang et al., 2002). Die SKY-FISH wurde weiterhin zur Untersuchung des Karyotyps verschiedener Zervixkarzinomzelllinien verwendet (u.a. Macville et al., 1999, Hidalgo et al., 2003). Cottage und Mitarbeiter untersuchten mittels SKY die Reihenfolge des Auftretens der chromosomalen Veränderungen nach Transfektion in HPV-positiven Zellen. Sie finden hierbei eine häufige Veränderung des Chromosoms 10 als spätes Ereignis. Sie schließen dabei auf eine Zielregion im Zentromerbereich als relevant für die Progression zur Immortalität der Linie (Cottage et al., 2001). Die SKY-FISH wird häufig in Kombination mit der CGH verwendet die insbesondere sogenannte springende Translokationen und segmentale springende Translokationen nicht detektieren kann. In der Arbeit von Padilla-Nash und Mitarbeitern wird verdeutlicht, dass Chromosomenarme oder Teile von Chromosomenarmen in unterschiedlichen Klonen auf unterschiedliche Empfängerchromosomen transloziert werden (Padilla-Nash et al., 2001). In HeLa-Zellen, einer Zelllinie aus einem zervikalen Adenokarzinom, waren der lange Arm des Chromosoms 3, Teile des kurzen Armes des Chromosoms 5,

q-terminale Bereiche der Chromosomen 9, 15, 20 und 21 sowie der p-terminale Bereich des Chromosoms 19 transloziert (Padilla-Nash et al., 2001).

#### **1.4 Ziel dieser Arbeit**

Die Transformation von normalem Epithel der Zervix über niedrig- bis höhergradige Läsionen zum invasiven Zervixkarzinom wird durch eine steigende Anzahl zellulärer und histomorphologischer Veränderungen reflektiert. Jedoch führt nicht jede Veränderung und HPV-Infektion zur Ausbildung einer Neoplasie, wie auch nicht jede neoplastische Veränderung zu einem Tumor auswächst. Das Erkennen jener Neoplasien, die tatsächlich zu einem Tumor führen, ist bisher nur bedingt möglich.

Entscheidend für die maligne Entartung zervikaler Epithelzellen ist die Expression der viralen Onkogene E6 und E7, die mit den Tumorsuppressorgenen p53 und pRB interagieren. Dadurch kommt es zu einer deregulierten Proliferation und genetischen Instabilität, die eine Anhäufung von Mutationen begünstigt.

Zytogenetische, molekularzytogenetische und molekularbiologische Analysen bestätigen das Vorhandensein von chromosomalen Aberrationen in einer Vielzahl von schwergradigen Läsionen und Zervixkarzinomen. Diese Aberrationen lassen eine Korrelation zur Lokalisation von Tumorsuppressorgenen und Onkogenen vermuten.

Als spezielle diagnostische Marker in der zervikalen Karzinogenese können z.B. die zellulären Proteine p16 und NET1/C4.8 angesehen werden. p16 ist ein Zyklin-abhängiger Kinase-Inhibitor. Durch die Expression von E6 und E7 wird er in den Zellen überexprimiert (zur Hausen, 1999). NET1/C4.8 ist ein Protein der Tetraspanin-Familie. Diese spielen eine Rolle u.a. in der Signaltransduktion. Seine Expression wurde mittels Immunhistochemie in Adenokarzinomen und wenig differenzierten Karzinomen der Zervix, sowie in 50% aller untersuchten CINII und CINIII, jedoch nicht in gesundem Gewebe der Zervix nachgewiesen (Wollscheid et al., 2002).

Ziel dieser Arbeit ist die Identifizierung von zytogenetischen Markern, die in der Progression zum Zervixkarzinom von Bedeutung sind. Zur Auffindung von Chromosomenaberrationen (vor allem struktureller Aberrationen) soll die SKY-FISH genutzt werden. Die erforderlichen Metaphasepräparate wurden aus humanen Keratinozyten nach Transfektion mit HPV16 und HPV 18-DNA zu unterschiedlichen Zeitpunkten während des Immortalisierungsprozesses generiert.

---

Die Ergebnisse der SKY-FISH sollen mit den für die HPK-Zellen bereits vorliegenden CGH-Ergebnissen (Solinas-Toldo et al., 1997) verglichen werden.

Die Relevanz ausgewählter numerischer Aberrationen wird mittels Interphasen-FISH an Schnitten paraffineingebetteter Zervixkarzinome (klinischen Proben) überprüft. Die Interphasen-FISH hat den Vorteil, die Einzelzellen zu betrachten. Im Gegensatz zu molekularbiologischen Methoden wird also z.B. in einem Abstrich von der Zervix nicht nur der Durchschnitt aller untersuchten Zellen betrachtet. Bei kleinen Läsionen sind aber gerade die Veränderungen einzelner Zellen interessant. Mit dieser Methode sollen insbesondere bereits bekannte chromosomale Veränderungen des kurzen Armes von Chromosom 10 untersucht werden.

Bestätigt sich die Relevanz neuer Marker, könnten diese u.U. für eine individuelle Prognose herangezogen werden.

Außerdem kann die Kenntnis der an der Karzinogenese beteiligten chromosomalen Regionen und der Gene, die sie beinhalten, zu einem besseren Verständnis der Abläufe der Tumorprogression und Metastasierung führen. Dieses Wissen kann bei der Entwicklung von Therapeutika hilfreich sein. Hierzu sind jedoch auch funktionelle Untersuchungen der betreffenden Gene oder Regionen notwendig, die in Folgestudien durchgeführt werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

100 bp ladder	Lifetechnologies, Gibco, Eggersheim
50 bp ladder	Lifetechnologies, Gibco, Eggersheim
Adenin (6-Aminopurin)	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Adenosin	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Agar	Difco, Detroit, USA
Agarose	Roth, Karlsruhe
Ammoniumsulfat	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Antibiotic/Antimycotic	Gibco/Invitrogen
Avidin Cy5	Jackson laboratory
Bovines Serumalbumin	Sigma/ Aldrich, Deisenhofen
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Calyculin A	Alexis:
Casein, Hydrolysat-Säure, salzfrei, vitaminfrei	ICN biochemicals, Eschwege
Chill out liquid wax	MJ Research inc.
Choleratoxin	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Colchicin	Sigma/ Aldrich, Deisenhofen
Cot-1-DNA	Gibco
DAPI (4',6'-Diamino-2-phenyl-indol-dihydrochlorid)	Sigma/ Aldrich, Deisenhofen
Deckgläser	Menzel, Braunschweig
Digoxigenin-11-dUTP	Roche, Mannheim
Digoxigenin-Detection Kit	Qbiogene, Heidelberg
Dispase	Sigma
D-MEM (Dulbeco`s Modified Eagle Medium)	Gibco/ Invitrogen
D-MEM-Pulver	Gibco/ Invitrogen
Dnase I	Roche, Mannheim
dNTPs	Boehringer, Mannheim
EDTA	Merck, Darmstadt

---

Epi Life Medium (Keratinocyten-Wachstumsmedium)	Cascade Biologies
Epidermal Growth Factor	Roche; 855731/grade I; 100µg
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol, unvergällt	Baker, Deventer, NL
Ethidiumbromid	Sigma/Aldrich/Aldrich, Deisenhofen
Expand-High-Fidelity-PCR-System	Roche, Mannheim
Färbekästen nach Hellendahl	Neolab, Heidelberg
fetales Kälberserum	Biowest, Frankreich
Ficoll Paque plus	Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden)
Fixogum	Marabuwerke, GmbH Co, Tamcu
Fluorescein-12-dUTP	Roche, Mannheim
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Formamid	Sigma/Aldrich Deisenhofen
Glucose	Sigma/Aldrich Deisenhofen
Glycerin	Sigma/Aldrich Deisenhofen
Ham`s F12 -Pulver	Invitrogen
HKGS (Human Keratinocyten Growth Supplement)	CascadeBiologies
Hybrisol VI	Qbiogene, Heidelberg
Hydrocortison	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Insulin	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Lachssperma DNA	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Lyticase	ICN biochemicals Eschwege
Magnesiumchlorid	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Magnesiumsulfat heptahydrat	Merck, Darmstadt
Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Methanol	Sigma/Aldrich Deisenhofen
Mouse Anti Digoxigenin	Sigma/Aldrich Deisenhofen
NaHCO <sub>3</sub>	Roth
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat (tri-Natriumcitratdihydrat)	Roth Karlsruhe

Natriumdodecylsulfat	Roth Karlsruhe
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriumrhodanit	Sigma/Aldrich Deisenhofen
N-Laroylsarcosine	Merck, Darmstadt
Objektträger	Menzel, Braunschweig
Paraformaldehyd	Sigma/Aldrich Deisenhofen
PBD	Qbiogene, Heidelberg
PBS	Lifetechnologies, Gibco, Eggersheim
Penicillin/ Streptomycin	Lifetechnologies, Gibco, Eggersheim
Pepsin	Sigma/Aldrich Deisenhofen
Phytohämagglutinin	Sigma/Aldrich Deisenhofen
p-Phenylendiamin	Sigma/Aldrich Deisenhofen
Primer D4F2, Sequenz: CAGGAGGTGGTCGTCATCAGN NNNNNAGGT	Lifetechnologies, Gibco, Eggersheim
Primer S2, Sequenz: CAGGAGGTGGTCGTACTCAG	Lifetechnologies, Gibco, Eggersheim
Propidiumiodid	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Proteinase K	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
RNase A	Roche, Mannheim
RPMI-Medium mit Glutamax	Lifetechnologies, Gibco, Eggersheim
Salzsäure	Roth Karlsruhe
Sheep Anti Mouse Cy 5.5	Amersham
Sonde D10Z1, Digoxigenin-markiert	Qbiogene, Heidelberg
Sonde D4Z1, Digoxigenin-markiert	Qbiogene, Heidelberg
Sorbitol	Sigma/Aldrich Deisenhofen
Tetramethylrhodamin-6-dUTP	Roche, Mannheim
Trisma Base, Tris-hydroxymethyl-aminomethan	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Trypsin	Gibco
Tween 20	Sigma/Aldrich, Deisenhofen
Xylenxyanol	Merck, Darmstadt
Xylol	Baker, Deventer; NL
Yeast nitrogen base ohne Aminosäuren und ohne Ammoniumsulfat	Difco, Augsburg

### 2.1.2 Geräte

Elektrophorese-Netzgerät: Power Pack P25, Biometra, Göttingen

Elektrophorese-Kammer: Blue Marine 100, Böhlinger, Ingelheim

Spektrophotometer: Spectronic Genesys 2 Milton Roy, Rochester, USA

Fluoreszenzmikroskop: Axioplan 2, Carl-Zeiss, Jena

Fluoreszenzmikroskop: Leica, Wetzlar

SKY-Filter

SKY-View

PCR-Gerät: Perkin Elmer Gene Amp PCR System 9600

Eppendorf Master Cycler Gradient, Hamburg

Thermomixer, Eppendorf, Hamburg

Heizplatte/ Eppendorf PCR-Cycler mit in-situ-Adapter

Zentrifugen: Eppendorf 5417 C und R

Megafuge R1, Heraeus Instruments

Mikrotom der Pathologie der FSU Jena

Die Objektträger für die Interphasen-FISH wurden in der Pathologie der FSU Jena mit Silan beschichtet.

### 2.1.3 Verwendete Gewebe und Zelllinien

Etwa 200 Biopsien aus CIN II/III wurden in den Universitäts-Frauenkliniken Jena, Erlangen und Freiburg entnommen.

Das frisch asservierte Tumorgewebe aus der Zervix von etwa 100 Patientinnen wurde von der Universitätsfrauenklinik Jena zur Verfügung gestellt.

Eine Vorhaut eines Kindes wurde in der Urologie des Universitätsklinikums Jena operativ entfernt und für die Studie zur Verfügung gestellt.

Die paraffineingebetteten Gewebe aus Zervixkarzinomen und CIN III wurden von Frau Dr. Kühne-Heid in der Pathologie des Universitätsklinikums in Jena auf ihre Eignung für die Verwendung in der Interphasen-FISH überprüft und geschnitten. Zusätzlich



wurden die HE-gefärbten Schnitte bereitgestellt. Ihre Beschreibung ist den Tabellen 2-1 und 2-2 zu entnehmen.

**Tabelle 2-2-1: Verwendete CIN-Läsionen**

CIN	Beschreibung
1	CIN III
2	CIN III, Metaplasie
3	CIN III
4	CIN III

**Tabelle 2-2 Für die Interphasen-FISH verwendete Gewebe (paraffineingebettet)**

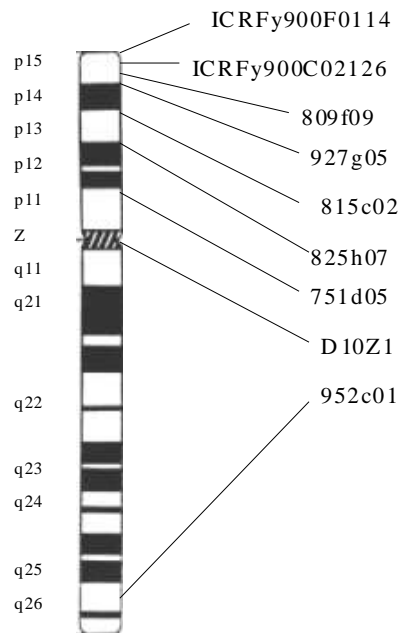
Tumor	Beschreibung	pTNM-Stadium, Grading (G)
1	Plattenepithelkarzinom	pT2, pN0, Mx, Grad 3
2	Plattenepithelkarzinom	pT2b
3	Plattenepithelkarzinom	pT2b
4	Plattenepithelkarzinom	pT1, pN0, M0, Grad 3
5	Plattenepithelkarzinom	pT3, G2
6	Plattenepithelkarzinom	pT1b2
7	Plattenepithelkarzinom	pT3a
8	Plattenepithelkarzinom	?
9	Plattenepithelkarzinom	pT2b
10	Plattenepithelkarzinom,	pT1, pN0, Mx, Grad 3
11	Plattenepithelkarzinom	pT3b
12	Adenokarzinom	pT2b
13	Plattenepithelkarzinom	?
14	Adenokarzinom	pT1b2
15	Plattenepithelkarzinom	pT2b

Die HPK-Zelllinien IA, II, III und V: Es handelt sich um Vorhautkeratinozyten, die mit HPV transfiziert wurden. HPK IA, II und III sind HPV 16, HPK V ist HPV 18 positiv.

Es wurden frühe Passagen (etwa Passage 10, bezogen auf die Populationsverdopplung) verwendet. Da die Linien bereits in vorhergegangenen Experimenten zu Immortalität geführt wurden, werden sie im folgenden als HPKIa-2, HPKII-2, HPKIII-2 und HPKV-2 bezeichnet.

#### 2.1.4 Hefestämme

Die Hefestämme mit künstlichen Hefechromosomen wurden vom Ressourcenzentrum des Max-Planck-Instituts in Berlin bezogen. Die Lokalisation der Inserts ist in Abbildung 2-1 dargestellt.



**Abbildung 2-1 Die Lokalisationen der verwendeten Sonden am Chromosom 10, schematisch dargestellt**

#### 2.1.5 Sonstiges Material

Pinzette

Glasküvetten

Fixogum

Deckgläser 18\*18mm und 24\*60mm

Feuchte Kammer

500ml Filter mit 45mm Schraubaufsatz; Porengröße 0,22µm Corning Costar

Objektträger

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Herstellung FAD-Medium

FAD-Medium ist eine Mischung aus Ham's F12- und D-MEM –Medium mit Adenin und Insulin sowie weiteren Zusätzen wie Choleratoxin, Epidermalem Wachstumsfaktor und Hydrocortisol. Es ist optimal für die Kultur von primären Keratinozyten, besonders unter der Verwendung von 3T3-Feeder-Zellen als Adhäsionshilfe und Donoren für weitere essentielle Wachstumsfaktoren für die Keratinozyten.

Zusätze:

*Hydrocortison:*

25 mg in 5 ml Ethanol lösen (Stock 5mg/ml bei 4°C lagern)

1,6 ml (5mg/ml) auf 10 ml serumfreies Medium

Endkonzentration: 800µg/ml; Aliquots bei –20°C lagern

*Choleratoxin*

0,5 mg Protein in 0,6 ml Ethanol suspendieren (auch in H<sub>2</sub>O löslich)

Endkonzentration: 10<sup>-5</sup> M kann bei 4°C gelagert werden

0,3 ml (10<sup>-5</sup> M) auf 15 ml Medium

Endkonzentration: 2 x 10<sup>-7</sup> M; Aliquots bei –20°C lagern

*Epidermal Growth Factor (EGF)*

100µg in 5 ml Medium lösen

20µg/ml; Aliquots (1ml) bei –70°C lagern

Zusammensetzung:

1800 ml Grundmedium (s.o.)

200 ml fetales Kälberserum

1 ml Hydrocortison (Stock 800 µg/ml)

1 ml Epidermal Growth Factor (Stock 20 µg/ml) (in obigen Medium lösen)

1 ml Choleratoxin (2 x 10<sup>-7</sup> M)

Für die Herstellung werden 5,365 g Ham's F12 –Pulver, 20,478g D-MEM-Pulver, 6,00g NaHCO<sub>3</sub> (als pH-Puffer) eingewogen und mit Aqua bidest. auf 2 Liter aufgefüllt.

2 ml Grundmedium abnehmen, 36,4 mg Adenosin und 10,0 mg Insulin darin aufnehmen, zum Lösen einen Tropfen 32% HCl zugeben. In das Grundmedium zurückgeben.

steril filtrieren (500ml Filter mit 45mm Schraubaufsatz; Porengröße 0,22µm)

Aliquots zu 200 ml bei -20°C einfrieren

Kurz vor Gebrauch ist Penicillin/Streptomycin (1:100) zuzugeben

### *2.2.2 Einfriermedium/ Einfrieren von Zellen*

*Einfriermedium:*

für 50ml Ansatz:

30ml D-MEM (Dulbeco`s Modified Eagle Medium)

15ml fetales Kälberserum

5ml DMSO

steril filtrieren und aliquotieren (10 ml/15 ml Röhrchen).

Die Aliquots am Besten vor dem ersten Gebrauch einfrieren.

Die einzufrierenden Zellen sind nach dem Trypsinieren bei 1100 rpm (bei 4°C) 4 min zu zentrifugieren, das Pellet in kaltem Einfriermedium resuspendieren. Pro 75cm<sup>2</sup> Flasche (80-90% Konfluenz) 2 ml Einfriermedium verwenden. Vor dem Überführen in flüssigen Stickstoff lagern die Tubes 48 Stunden bei -80°C.

### *2.2.3 Auftauen von Zellen aus flüssigem Stickstoff*

Das Auftauen im Wasserbad bei 37°C unter ständiger Bewegung sollte schnell erfolgen, denn das DMSO wirkt toxisch auf die Zellen. Danach die Zellen auf Eis stellen. Das Medium muß nicht erwärmt werden. Die Zellen werden in 7 ml Medium resuspendiert und in ein 15ml Röhrchen gegeben. Anschließend bei 1100 rpm (bei 4°C) 4 min zentrifugieren, das Medium absaugen. Das Pellet wird in frischem Medium aufgenommen und in Kulturflasche gegeben.

#### 2.2.4 Isolierung humaner Epidermiszellen aus Vorhäuten

*Lösungen:*

*D-MEM mit Antibiotic/ Antimycotic*

PBS

*Trypsin/EDTA:* 1 Liter 1x PBS, 0,5 g Trypsin, 4 ml EDTA, 0,5 M pH=8.0, Filtrieren, Aliquotieren in 50 ml Röhrchen, bei -20°C lagern

Zum Entfernen der Antiseptica muß die Vorhaut zunächst einen Tag gespült werden. Hierzu wird sie in ein 50 ml Röhrchen mit D-MEM mit Antibiotic/ Antimycotic (0,5 ml auf 50 ml Medium) überführt.

In einer mit PBS gefüllten 10cm-Petrischale wird das Hautstück mit einer Schere von dem Fettgewebe unter der Epidermis befreit; bis eine dünne Hautschicht übrig bleibt. Die Pinzetten und die gebogene Schere wurden vorher in 90% Ethanol getaucht und abgeflammt.

Es werden 6cm-Schalen mit je 4ml Trypsin/EDTA und 1ml D-MEM ohne Zusätze vorbereitet. Die in kleine Stücke geschnittenen Hautstücke müssen so in das Trypsin gelegt werden, dass die Epidermis schwimmt, um sich abzulösen. Das Gewebe inkubiert im Brutschrank bei 37°C für 4-5 Stunden. In dieser Zeit D-MEM Medium (mit FCS und Penicillin/ Streptomycin) vorwärmen und bereitstellen.

Die Hautstücke werden in 2ml des vorgewärmten Mediums in 6`er Schalen mit der Epidermis nach oben liegend von dieser Hautschicht befreit, indem sie mit der Pinzette abgezogen und abgeschabt werden. Die Keratinozyten liegen unter der Epidermis und liegen dann im Medium. Das Fettgewebe wird als Abfall verworfen. Die Zellen werden in Medium resuspendiert und in 6er Schalen mit 3 ml Keratinozyten-Wachstumsmedium gegeben, für 2 Tage im Brutschrank inkubiert und dabei nicht bewegt.

Die Keratinozyten wachsen aus. Die Kulturen enthalten jedoch meistens auch Fibroblasten, welche beim Splitten der Zellen entfernt werden können.

### 2.2.5 Herstellung einer 3T3-Feeder-Zell-Kultur

3T3-Zellen können in D-MEM-Medium mit fötalem Kälberserum kultiviert werden. Sind sie 80% konfluent müssen sie gesplittet werden. Der Großteil kann schon als Feeder-Zellen Verwendung finden.

Die geernteten Zellen sind durch die folgende Gamma-Bestrahlung (60 Gray) in ihrem Wachstum gehemmt, weil die DNA unter Einfluß der ionisierenden Strahlung zerbricht.

Es werden  $5 \times 10^5$  Zellen pro 6 cm-Kulturschale ausgesät. Sie dienen als nicht definierte Wachstumsfaktoren. Können nur wenige zum Wachstum fähige Zellen (z.B. primär kultivierte Zellen) gewonnen werden, sind Feeder adhäsionsvermittelnd.

### 2.2.6 Isolierung humaner Keratinozyten aus Tumorgewebe

Das Gewebe wird nach der Entnahme möglichst schnell aufgearbeitet. Nach dem Spülen mit Penicillin und Streptomycin zum Entfernen der Bakterienflora erfolgt die mechanische Zerkleinerung mit dem Skalpell. Anschließend wird das Gewebe in einer Enzymlösung inkubiert, am Besten über Nacht. Diese Lösung enthält Medium (z.B. Keratinzytenmedium ohne Serum), Antibiotika und ein Protein-lysierendes Enzym. Tests (Brink et al., 2002) haben gezeigt, dass Dispase (etwa 2,4U/ml) am Effektivsten ist und gleichzeitig die Vitalität der Zellen am Wenigsten stört (s. Ergebnisse).

Am nächsten Tag werden die Gewebestückchen auf den Boden einer Petrischale gesetzt. Der Abstand darf nicht zu groß sein. Nachdem die Zellklumpen angetrocknet sind, werden sie vorsichtig mit etwas FAD-Medium überschichtet. Zur Vermeidung des Austrocknens erfolgt die Inkubation im Brutschrank in einer feuchten Kammer. Die Schalen sollten drei Tage nicht bewegt werden.

Danach wird unter Zugabe von bestrahlten  $5 \times 10^5$  3T3-Mausfibroblasten pro 6cm-Kulturschale das Medium gewechselt.

### 2.2.7 Splitten der Keratinozyten: Entfernen der Fibroblasten

Sind die Zellen dicht gewachsen, müssen sie gesplittet werden.

Dazu wird das Medium entfernt. 2 ml Trypsin/EDTA zugeben, nach kurzem Inkubieren bei Raumtemperatur erfolgt eine mikroskopische Kontrolle, runden sich die Zellen ab, erfolgt schnelles Absaugen von Trypsin /EDTA. Da sich die Fibroblasten schneller lösen als die Keratinozyten, entfernt man so die Fibroblasten. Anschließend wird 1ml

Trypsin/EDTA auf die Zellen gegeben und für 1-3 min im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

Das Trypsin muß neutralisiert werden, da im Keratinozyten-Wachstumsmedium keine neutralisierende Substanz enthalten ist, werden die Zellen in 7ml D-MEM (mit FCS und Penicillin/ Streptomycin) aufgenommen und in ein 15 ml Röhrchen gegeben und bei 1100 rpm, 4 min. bei 4°C abzentrifugiert.

Nach Entfernung des Überstandes wird das Pellet in etwas Keratinozyten-Wachstumsmedium aufgenommen und auf zwei 6er-Schalen verteilt oder in eine 25cm<sup>2</sup>-Flasche gegeben. Das Medium wird auf ca. 4ml (Schale) bzw. 5ml aufgefüllt.

### 2.2.8 Chromosomenaufarbeitung aus Zellen, in Monolayer wachsend

(Mengen für 25cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen)

#### *Lösungen*

##### *hypotone Lösung:*

0,4g Na-Citrat auf 100 ml Wasser

0,4g KCL auf 100 ml Wasser

Am Aufarbeitungstag 1:1 mischen und auf 37°C erwärmen

##### *Fixativ:*

Methanol und Essigsäure im Verhältnis 4:1 mischen und kühl stellen (4°C)

##### *Trypsin-EDTA-Lösung:*

Verwendung bei Raumtemperatur

Außerdem:

*Objektträger:* in Küvette mit Aqua dest. - auf Eis stellen

Bei einer ausreichenden Anzahl teilungsaktiver, runder Zellen werden 50µl (100 µg/ml) Colcemid pro 75 cm<sup>2</sup>-Flasche zugegeben. Nach Einwirken des Colchicins für ca. 3 Stunden wird die Menge an runden Zellen nochmals beurteilt. Das Medium in Zentrifugenröhrchen abgießen, 2 ml Trypsin/EDTA- Lösung in die Zellkulturflasche geben und 2–4 min einwirken lassen. Das Ablösen der Zellen wird unter dem Invertmikroskop beobachtet und u.U. „abgeklopft“. Die Zellen werden in dem

gesammelten Medium resuspendiert und die Wachstumsfläche mehrmals abgespült, und in dem Röhrchen 1500 rpm für 10 min zentrifugiert.

Der Überstand wird bis auf etwa 0,5 ml abgenommen das Pellet wird darin vorsichtig resuspendiert.

3 ml hypotone Lösung (37°C) werden in drei bis vier Schritten zugegeben, dazwischen wiederholt resuspendiert. Anschließend erfolgt eine Inkubation für 45-55 min (bei 37°C). Die Dauer dieses Schrittes muß für unterschiedliche Zellen optimiert werden.

Anschließend wird der Überstand abzentrifugiert und abgenommen (bis ca. 0,5 ml über dem Pellet) und das Pellet vorsichtig resuspendiert. Anschließend 3 ml Fixativ (ca. 4°C) sehr vorsichtig zugeben und dazwischen immer wieder resuspendieren und für 20 min (bei 4°C) inkubiert.

Anschließend bei 1500 rpm für 5 min zentrifugieren.

Der Überstand wird oben angegebener Form abgenommen und das Pellet vorsichtig aufgemischt.

Erneut werden zum Waschen 2-3 ml Fixativ (ca. 4°C) vorsichtig zugegeben, worauf ein erneuter Zentrifugationsschritt erfolgt.

Schließlich wird der Überstand bis zum Pellet abgenommen und mit einigen Tropfen (abhängig von der Größe des Pellets) frischen Fixativs resuspendiert und mit der Pipette tropfenweise auf die kalten, nasse Objektträger aufgetropft.

Die Objektträger auf einer Heizplatte (ca. 40°C) trocknen oder lufttrocknen.

Bei weiterführender FISH sollten die Objektträger nicht „gealtert“ werden.

#### 2.2.9 Gewinnung von *Premature condensed chromosomes (PCC)* mit *Calyculin A* aus Zellen in Kultur

##### *Lösungen:*

*Calyculin A*: Pro 10 µg in 100 µl DMSO lösen. Lichtgeschützt bei -20°C aufbewahren.

Hypotone Lösung: 1g KCL/100 ml H<sub>2</sub>O, pro Ansatz 5ml, bei 37°C vorwärmen

*Fixativ*: 4 Volumenteile Methanol/ 1 Volumenteil Eisessig, pro Ansatz 20ml, auf Eis stellen.



*Sonstiges:*

Objektträger: in Küvette mit Aqua dest. - auf Eis stellen

*Vorgehensweise:*

Am Tag vorher wird das Medium gewechselt, um pro 75cm<sup>2</sup> Flasche 10ml Medium zu bekommen. Dadurch ist ein sparsamer Umgang mit dem Calyculin A gewährleistet.

Am Tag der Aufarbeitung erfolgt die Zugabe von 5µl Calyculin A- Stammlösung pro 5ml Medium welches 1Stunde bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Bei der Begutachtung unter dem Invertmikroskop sollten sich fast alle Zellen abgelöst haben. Dann die Zellsuspension in ein Röhrchen überführen, dabei sollte mehrere Male über die Wachstumsfläche gespült werden. Nach einer 5minütigen Zentrifugation bei 1100rpm wird das Medium entfernt.

Anschließend erfolgt eine schrittweise und vorsichtige Zugabe der hypotonen Lösung (5 ml). Diese inkubiert 10-15min bei 37°C. Die Lösung wird wieder bei 1100rpm, 5 min abzentrifugiert und entfernt.

Schrittweise und vorsichtig wird dann das Fixativ (5 ml) auf das Pellet pipettiert. Das Röhrchen inkubiert auf Eis für 30min. Mittels Zentrifugation (1100rpm, 5 min) wird wieder der Überstand entfernt.

Das Waschen erfolgt wie bei der Aufarbeitung mit Colchicin: Das Pellet in 5ml Fixativ resuspendieren und zentrifugieren, Überstand entfernen. Dieser Schritt wird noch einmal wiederholt.

Zum Schluß wird etwa 1ml Fixativ zugegeben, das Pellet gut resuspendiert. Es folgt das Auftropfen der Suspension auf die nassen und kalten Objektträger. Diese trocknen lassen, ggf. die Kerndichte auf dem ersten Objektträger vor dem Auftropfen der restlichen Suspension begutachten.

Die Objektträger sind nach 2 Tagen für Hybridisierungen verwendbar. (für längerfristige Aufbewahrung Objektträger dehydrieren und anschließend bei -20°C einfrieren).

### 2.2.10 SKY-FISH (*Spectral karyotyping*)

Die SKY-FISH wurde unter Verwendung fertiger Sonden durchgeführt. Die Zusammensetzung der Sonden findet sich in der Abbildung 2-2.

Fluorochrome	Chromosome																							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	X	Y
SpectrumGreen	x		x		x		x	x	x			x	x					x		x	x		x	x
SpectrumOrange					x				x		x		x		x	x		x	x	x		x		x
Texas red	x			x	x	x						x		x	x			x				x	x	
Biotin/Cy5	x		x	x			x			x		x			x		x		x	x		x		x
Digoxigenin/Cy5.5		x	x		x	x			x	x		x				x					x	x		x
Number of DOP-PCRs	3	1	3	2	4	2	2	1	3	2	1	4	2	1	3	2	1	3	2	3	2	4	2	4

**Abbildung 2-2 Markierungsschema für die SKY-Sonden (aus Macville et al., 1997). Insgesamt werden 57 einzelne degenerierte oligonukleotid-geprimte (DOP) Markierungsreaktionen durchgeführt. Es werden dadurch 24 einzigartige Emissionsspektren erzeugt**

#### 2.2.10.1 Vorbehandlung der Objektträger

Auswahl: Mindestens 10 Metaphasen, deren Chromosomen gut verteilt sind und nicht überlappen, müssen unter ein Deckglas der Größe 18\*18mm passen. Alternativ muß die Sonde portioniert werden und das Deckglas zerschnitten werden, um an den entsprechenden Stellen hybridisiert zu werden.

*Lösungen:*

20x SSC (*sodium saline citrate*):

0,3M Natriumcitrat

3,0M Natriumchlorid

1M Tris-HCl: mit HCl auf pH 8 einstellen

400ml 2x SSC (RT)

*RNase A:*

Stammlösung: 20mg/ml in sterilem Wasser lösen, 15 min kochen, abkühlen lassen, aliquotieren, bei -20°C aufbewahren (Stammlösung nicht vortexen)

100ml 0,01M HCl pH 2:

in einer Flasche mit Schraubverschluß im Wasserbad auf 37°C erwärmen, leere Küvette mit wärmen!

*Pepsin:*

Stammlösung 10% = 100mg/ml, in sterilem Wasser lösen, auf Eis stellen, 50µl Aliquots herstellen. Bei -20°C aufbewahren

*200ml PBS/MgCl<sub>2</sub>:*

10ml 1M MgCl<sub>2</sub> mit 190ml 1x PBS mischen

*100ml 1% Formaldehyd:*

2,7ml 37% Formaldehyd mit 97,3ml PBS/MgCl<sub>2</sub> mischen

*Ethanolreihe:* je 100ml 70%, 80% und 96%

*Vorgehensweise :*

Den Objektträger durch Einwirken in 2x SSC (RT) equilibrieren.

Währenddessen die RNase A-Stammlösung 1:200 in 2xSSC verdünnen, 120µl auf ein Deckglas (24\*60mm) pipettieren, mit dem feuchten Objektträger das Glas aufnehmen, 45 min in der feuchten Kammer bei 37°C inkubieren.

Mit der Pinzette das Deckglas abnehmen, den Objektträger 3x 5min in 2xSSC (RT) auf dem Schüttler waschen.

Bis zu 10µl Pepsin-Stammlösung in ein Becherglas geben, die HCl-Lösung (0,01 M) daraufgeben, gut schwenken und in die vorgewärmte Glasküvette geben. Objektträger 4min inkubieren.

Den Objektträger in PBS tauchen. Im Phasenkontrast-Mikroskop wird überprüft, ob der Pepsin-Verdau ausreicht: Die Chromosomen sollten grau und flach erscheinen. Wenn notwendig, den Verdau wiederholen. Allerdings muß ein zu starker Verdau vermieden werden!

Den Objektträger 2x 5min in PBS (RT) (Schüttler) waschen, dann 5 min in PBS/MgCl<sub>2</sub> (RT) (Schüttler) inkubieren. Anschließend für 10 min in 1% Formaldehyd (unter dem Abzug) fixieren. 5min in PBS bei Raumtemperatur waschen.

Zum Dehydrieren je 3min in 70, 80, 96% Ethanol stellen, anschließend den Objektträger lufttrocknen lassen.

### 2.2.10.2 Sonden-Präzipitation und Hybridisierung

#### *Lösungen:*

*Hybridisierungsmix:* 50ml deionisiertes Formamid, 5ml 20x SSC, 25ml steriles Wasser mischen, auf pH 7,0 einstellen, mit 20ml 50% Dextransulfat mischen (=100ml), autoklavieren, aliquotieren, bei 4°C aufbewahren

*Denaturierungsmix:* 70ml deionisiertes Formamid, 3ml 20x SSC, 27ml steriles Wasser (=100ml). Auf pH 7,0 einstellen, aliquotieren, bei -20°C aufbewahren

*Sonde:* (hergestellt durch die Mitarbeiter der AG Tumorgenetik in Berlin); Sondengemisch aus einzelnen PCR-Produkten; ca. 3µl von jeder painting-Sonde.

#### *3M Natriumacetat*

100% Ethanol, auf Eis stellen

70% Ethanol, auf Eis

*Ethanolreihe:* je 100ml 70%, 80% und 96%, eiskalt

*Vorgehensweise* (ist die Sonde schon präzipitiert, beim Denaturierungsschritt beginnen)

Die Sonde, 25µl Cot1-DNA, 1µl Lachssperma-DNA, ein Zehntel des Ansatz-Volumens Natriumacetat mischen und vortexen. Das 2,5-3,0fache des Ansatz-Volumens 100%igen, kalten Ethanols zugeben und vortexen, bei -20°C für eine Stunde oder -80°C für mindestens 15-30min fällen.

30min bei 13000rpm und 4°C zentrifugieren, den Überstand abnehmen. 500µl 70% Ethanol zugeben, vortexen, zentrifugieren bei 13000rpm, 4°C, 15min. Den Überstand abnehmen, Pellet 10 min trocknen lassen.

10µl Hybridisierungsmix zugeben, die Sonden darin mindestens 30min bei 37°C im Thermomixer lösen (bzw. auftauen) und vorwärmen.

Die Sonde anschließend bei 80-88°C 5-7min denaturieren (Thermomixer), anschließend bei 37°C 1-4 Stunden unter Schütteln preannealen.

120µl Denaturierungsmix auf ein Deckglas (24x60mm) pipettieren, mit dem trockenen Objektträger aufnehmen, den Objektträger auf die heiße Platte legen (80°C auf der Platte ergibt 72-74°C auf dem Objektträger), die Chromosomen für 1min 45sec abgedeckt denaturieren lassen.

Den Objektträger sofort in den eiskalten 70% Ethanol stellen, 3 min inkubieren, danach je 3 min in 80 und 96% Ethanol (4°C) dehydrieren.

Die Objektträger lufttrocknen lassen.

Die Sonde auf die ausgewählte Stelle pipettieren, mit 18\*18mm Deckglas abdecken und mit Fixogum versiegeln.

Über 2 Nächte bei 37°C in einer feuchten Kammer hybridisieren.

### *2.2.10.3 Detektion*

*Lösungen:*

*Formamid /SSC:*

30ml 20xSSC, 120ml steriles Wasser, 150ml Formamid, auf pH 7,0 einstellen. Auf 45°C erwärmen (30min)

*1xSSC:*

25ml 20xSSC, 475ml Wasser, pH 7,0 einstellen, auf 45°C erwärmen

*4xSSC/Tween 20:*

100ml 20xSSC, 400ml Wasser, auf pH 7,0 einstellen. 0,5ml Tween 20 zugeben, mischen. Auf 45°C erwärmen.

*Blocking Solution (3% BSA):*

0,3g Bovines Serum Albumin-Pulver zu 10ml vorgewärmter 4xSSC/Tween20 geben, vortexen und bei 37°C lösen

Mouse Anti Digoxigenin (Sigma D8156) wie angegeben lösen,

Sheep Anti Mouse Cy 5.5, wie angegeben lösen,

Avidin Cy5 wie angegeben lösen

*DAPI-Lösung:*

Stammlösung: 2mg DAPI/10ml steriles Wasser (=0,2mg/ml).

20µl Stammlösung/ 100ml 2xSSC

*Antifading solution:*

100mg p-Phenylenediamin in 2ml sterilem 1 x PBS lösen, auf pH 8 einstellen, auf 10ml auffüllen. Mit 90ml 86% Glycerol mischen. In dunkle Tubes aliquotieren. Bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahren.

Ethanolreihe: je 100ml 70%, 80% und 96%

*Vorgehensweise:*

Das Fixogum und das Deckglas vorsichtig entfernen, ggf. Objektträger kurz in die Formamid/SSC-Lösung tauchen. Bei allen weiteren Schritten die Exposition der Objektträger zum Licht vermeiden, hierfür sollte auch der Färbekasten aus Glas mit Alufolie umwickelt werden.

Den Objektträger 3x 5min in Formamid/SSC auf dem Schüttler waschen, ein weiterer Waschschrift erfolgt für 3x 5min in 1x SSC, ebenfalls auf dem Schüttler.

Objektträger in 4xSSC/Tween 20 tauchen, nicht trocken werden lassen!

120 $\mu\text{l}$  Blocking-Lösung auf ein 24\*60 mm Deckglas pipettieren, mit dem feuchten Objektträger aufnehmen. In feuchter Kammer 30min bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubieren.

Fluoreszierende Antikörper vor dem Verdünnen bei 13000rpm für 3min ( $4^{\circ}\text{C}$ ) abzentrifugieren, es wird der Überstand verwendet.

Die Antikörperstammlösungen werden wie folgt verdünnt:

Ansatz 1: Avidin Cy5 und Mouse Anti Digoxin in 4xSSC/Tween 20 1:200 verdünnen.

Ansatz 2: Anti Mouse Cy5.5 in 4xSSC/Tween20 1:200 verdünnen

Den Objektträger in 4xSSC/Tween 20 tauchen, anschließend 120 $\mu\text{l}$  vom Ansatz 1 auf ein Deckglas (24\*60mm) pipettieren, mit dem feuchten Objektträger aufnehmen. In feuchter Kammer bei  $37^{\circ}\text{C}$  für 45-60 min inkubieren.

Das Waschen erfolgt 3x 5min in 4xSSC/Tween 20 (Schüttler).

120 $\mu\text{l}$  vom Ansatz 2 auf ein Deckglas (24\*60mm) pipettieren, mit dem feuchten Objektträger aufnehmen. In feuchter Kammer bei  $37^{\circ}\text{C}$  für 45-60 min inkubieren.

Anschließend erfolgt wieder ein Waschschrift : 3x 5min 4xSSC/Tween 20 (Schüttler).

Zum Färben der Chromosomen werden die Objektträger in der DAPI-Lösung für 10 min inkubiert.

Auch diese Lösung wird abgewaschen, in destilliertem Wasser für 5min (Schüttler).

Nach dem Dehydrieren in je 3min in 70, 80, 96% Ethanol wird der Objektträger luftgetrocknet.

30-35µl Antifading solution auf ein Deckglas (24x60mm) geben, Objektträger darauf legen. Im Dunkeln bei 4°C maximal 6 Tage aufbewahren.

#### *2.2.10.4 Aufnahme*

Die Aufnahme erfolgt an einem Mikroskop ausgestattet mit einem SKY- und einem DAPI-Filter, Objektivvergrößerung 63x. Das Aufnehmen für die vorliegende Arbeit wurden in der Arbeitsgruppe Tumorgenetik an der Charité in Berlin durchgeführt.

Als Auswertungssoftware ist (SKY Vision) erforderlich. Nacheinander werden die Metaphasen unter dem Licht des SKY-Filters (\*.raw Datei) und unter dem DAPI-Filter (\*.tif Datei) aufgenommen und gespeichert.

#### *2.2.10.5 Auswertung und Dokumentation*

Mit Hilfe des SKY-view-Programms werden die zwei Dateien zu einer \*.sky Datei verarbeitet. Danach werden die Konturen automatisch festgelegt und manuell korrigiert und das Karyogramm automatisch gelegt, manuell bearbeitet und nochmals automatisch überprüft.

Die Karyogramme werden auf Formblättern aufgezeichnet, dabei werden die Zahl der einzelnen Chromosomen notiert, auch die Zahl und Art der Markerchromosomen wird dokumentiert.

Die korrekte Zuordnung der Chromosomen und Marker wurde von Frau Dr. Backsch überprüft und diskutiert.

#### *2.2.11 Chromosomenpräparation aus Blutlymphozyten*

Die richtige Lokalisation der Sonden sollte durch Hybridisierung auf normalen Metaphase-Chromosomen überprüft werden.

Hierzu werden Chromosomenpräparate aus Blutlymphozyten hergestellt.

0,3- 0,5ml Blut in Heparin zur Vermeidung der Agglutination werden in 10ml RPMI-Medium (enthält Glutamax), mit Zusatz von 10% fetalem Kälberserum und 100U/ml Penicillin und 100µg/ml Streptomycin unter Zugabe von 0,1ml 10mg/ml Phytohämagglutinin als Mitogen 72 Stunden in Suspensionskultur bei 37°C bei 5%CO<sub>2</sub> kultiviert.

Es folgt eine Inkubation mit Colcemid bei 37°C für 45 min, wobei die Zellen in der Metaphase arretiert werden. Nach Überführung der Kultur in ein Zentrifugenröhrchen erfolgt Zentrifugation bei 800rpm für 8 min.

Entfernen des Überstandes, Zugabe von 5ml 0,056 M KCl, gut durchmischen und bei 37°C für 15 min inkubieren.

Erneute Zentrifugation (wie oben) und Entfernen des Überstandes, dann vorsichtige und schrittweise Zugabe von 5 ml kalten Fixativs (Methanol: Eisessig im Verhältnis 4:1) und 15minütige Inkubation bei 4°C. Nach Zentrifugation und Entfernen des Überstandes erfolgt 2maliges Waschen mit je 5ml Fixativ.

Schließlich werden die Zellen in 0,5-1ml Fixativ resuspendiert und auf kalte und nasse Objektträger aufgetropft und durch Blasen verteilt. Die Objektträger werden luftgetrocknet.



## 2.2.12 Interphasen-FISH

### 2.2.12.1 Herstellung der Sonden

#### 2.2.12.1.1 Kultur der Hefestämme

##### *Flüssigmedium:*

AHC-Medium: 1,7g yeast nitrogen base ohne Aminosäuren und Ammoniumsulfat

5g Ammoniumsulfat

10g Casein hydrolysat-acid, salz- und vitaminfrei

100mg 6-Aminopurin

Die Bestandteile werden in einem Endvolumen von 900ml Aqua bidest gelöst, der pH wird auf 5,8 eingestellt. Nach dem Autoklavieren (120°C, 20 min, 1 bar) werden 100ml sterile 20% (w/v) Glucose zugegeben.

##### *Platten:*

AHC-Medium: 1,7g yeast nitrogen base ohne Aminosäuren und Ammoniumsulfat

5g Ammoniumsulfat

10g Casein hydrolysat-acid, salz- und vitaminfrei

20mg 6-Aminopurin

20g Agar

Die Bestandteile werden wie bei dem Flüssigmedium in 900ml Aqua bidest gelöst. Der pH-Wert wird auf 5,8 eingestellt und das Medium wird autoklaviert (s.o.).

Es wird 100ml sterile 20% (w/v) Glucose-Lösung zugefügt und gemischt. Mit dem auf etwa 50°C abgekühlten Agar werden Platten gegossen.

Zur Vermeidung der Kontamination mit Bakterien werden bei der Kultur von Hefezellen autoklavierte Glasgefäße und Pipettenspitzen benutzt. Alle Glaspipetten und Impfösen werden vor Gebrauch abgeflammt.

Zur Herstellung von Sonden, die den Bereich des p-Arms auf dem Chromosom 10 abdecken, wurden Hefestämme mit künstlichem Chromosom mit einem entsprechenden

Insert vom Ressourcenzentrum des Max-Planck-Instituts für Molekulare Genetik in Berlin verwendet.

Aus dem gelieferten Schrägagar werden mit einer abgeflamten Impföse Hefezellen einer Kolonie auf AHC-Platten ausgestrichen. Inkubation erfolgt 24 Stunden bei 30°C.

Hefezellen mit dem Insert aus humaner DNA sind rot pigmentiert, weil das Insert das SUP(ochre)-Gen unterbricht. Dieses Gen ist Bestandteil der Purin-Biosynthese und liegt im natürlichen Genom des Wirtstammes AB1380 nicht vor, somit wird dieser Stoffwechselweg blockiert. Es akkumulieren rote Intermediate in der Zelle.

Ein Verlust der beiden Arme des künstlichen Chromosoms wird aufgrund der beiden Gene *ura* und *trp* verhindert. Uracil und Tryptophan liegen im Medium nicht vor, so daß die Zelle ohne diese Gene nicht wachsen kann (Burke et al. 1987, Current Protocols of molecular biology).

Einzelkolonien werden in 20ml AHC-Flüssigmedium in einem 250ml Erlenmeyerkolben (um eine ausreichende Versorgung der Zellen mit Sauerstoff zu gewährleisten) inokuliert und 2 Tage bei 30°C und 250 rpm im Orbitalschüttler inkubiert. Das Medium sollte laut Protokoll rosa angefärbt sein.

#### 2.2.12.1.2 Stammkulturen

Zur Aufbewahrung der Hefezellen wird 1ml Flüssigkultur in AHC-Medium mit 4ml 80%iger Glycerollösung (Endkonzentration 20%) gemischt und portioniert. In Einfriertubes werden die Stammkulturen bei -80°C aufbewahrt.

#### 2.2.12.1.3 DNA-Extraktion

Sorbitol-EDTA: 1M Sorbitol

0,1M EDTA pH 8,0

TE (Tris-EDTA): 50mM Tris-HCl, pH 7,4

20mM EDTA

5M Kalium-Acetat (100ml): 60ml 5M Kalium-Acetat

11,5ml Eisessig

28,5ml Aqua bidest, auf pH 5,2 einstellen

Die Kultur wird in zwei Zentrifugenröhrchen überführt und bei 3500rpm und 4°C 5 min zentrifugiert, das Medium verworfen. Das Pellet wird in Sorbitol-EDTA resuspendiert. Nach Zugabe von 70000 U Lyticase erfolgt eine 30 minütige Inkubation bei 37°C. Die Spheroblasten werden abzentrifugiert und in 0,5ml Tris/EDTA und 50µl 10% SDS-Lösung resuspendiert und bei 65°C erfolgt eine 30 minütige Proteindenaturierung.

Es folgt ein erneutes Zentrifugieren, der Überstand wird zur Fällung der DNA mit 0,2 ml 5M Kalium-Acetat pH 5,2 versetzt, 1 Stunde auf Eis stehengelassen und anschließend mit Ethanol (2 Volumen) oder Isopropanol (1 Volumen) ausgefällt. Die DNA wird in TE-Puffer über Nacht bei 37°C gelöst.

Die DNA-Konzentration wird bei 260nm, die Verunreinigung durch Proteine bei 280nm im Spektrophotometer bestimmt.

#### 2.2.12.1.4 Polymerase chain reaction

Das Pipettieren der Reaktionsgemische für die PCR wurden in der Laminar air flood-hood durchgeführt, um Kontamination zu vermeiden. Die DOP-Primer (degenerate oligo PCR) annealen in den ersten 5 Zyklen bei 25°C, was zur Folge hat, daß viel DNA unspezifisch amplifiziert wird. Wasser wird autoklaviert und es werden gestopfte Pipettenspitzen benutzt.

Als Positivkontrolle wurde DNA aus HPKII-Zellen verwendet, als Negativkontrolle Wasser.

Die Amplifikation der Hefe-DNA erfolgte unter folgenden PCR-Bedingungen (nach Reichelt, 1997):

*Lösung A:*

1g/l BSA

1x Expand HF-Puffer

0,2mM dNTP-Mix (equimolar ATCG)

2µM Primer D4S2

1,75mM MgCl<sub>2</sub>

0,05U/ml Expand High Fidelity

Aqua bidest ad 9,5µl

0,5µl der DNA-Lösung auf 9,5µl Lösung A.

In der Pause (s.u.) Zugabe von 40µl

*Lösung B:*

1x Expand HF-Puffer

0,2mM dNTP-Mix

1µM Primer S2

1,75mM MgCl<sub>2</sub>

0,05U/ml Expand High Fidelity

Aqua bidest ad 40µl je Ansatz

Programm:

	T in °C	t in min:s	
1)	95	3:00	
2)	25	2:00	10% Rampe zu 45°C
3)	Temperaturanstieg von 25° auf 45°C in 2 min		
4)	72	1:00	
5)	95	0:20	8x 2)-5)
6)	95	0:20	
7)	72	2:00	
8)	60	1:00	Nach 8) Pause im 1. Zyklus, Zugabe von Lösung A
9)	72	1:30	13x 6)-9)
10)	95	0:20	
11)	60	1:00	
12)	72	1:30	13x 10)-12)
13)	72	7:00	
14)	4	Bis zum Weiterführen	

*2.2.12.2 Gelelektrophorese von PCR-Amplifikaten:*

3%iges Agarose-Gel in TBE

TBE-Puffer:

100mM Tris-Borat (pH 8,3), 2mM EDTA

Ethidiumbromid-Lösung:

10mg/ml in A. bidest

5x Ladepuffer:

5% (v/v) Ficoll, 50mM EDTA, 5xTBE-Puffer, 0,05% (w/v) Bromphenolblau, 0,05% (w/v) Xylenxanol

Markierung

Die anschließende Labelling-PCR erfolgte unter folgenden Bedingungen:

6μM S2

je 0,2 mM ATP, GTP, CTP

0,024mM dTTP

1x Expand High Fidelity Puffer

4mM MgCl<sub>2</sub>

0,1mM Fluoreszein-12-dUTP

0,1U/ml Expand High Fidelity Polymerase

aqua bidest ad 9μl

1μl aus dem Shuttle-PCR-Produkt auf 9μl Mastermix

Für die Markierung mit Digoxigenin sind anstelle des Fluoreszein-12-dUTPs 0,05mM Digoxigenin-11-dUTP sowie 0,15mM dTTP erforderlich.

Programm:

	T in °C	t in min:s	
1)	95	0:20	
2)	50	1:00	
3)	72	3:00	25x 1)-3)
4)	72	7:00	
5)	4	Bis zum Weiterführen	

### 2.2.12.3 Verkürzen der markierten DNA

Eine Verkürzung der Amplifikate durch einen DNaseI-Verdau ist erforderlich, um die Sonden beweglicher zu machen. Hierzu wird Einzelstrangpuffer (Endkonzentration: 10mM Tris-HCl pH 7,5, 50mM KCl, 0,5 mM CaCl<sub>2</sub>, 5mM MgSO<sub>4</sub>), 2U DNaseI (Endkonzentration 0,2U) mit 10µl Sondenansatz gemischt. Der Verdau erfolgt dann im PCR-Gerät. Je nach Länge der Amplifikate wird eine Verdauzeit zwischen 2:30min und 4 min bei 37°C benötigt, gefolgt von 5 min zur Deaktivierung der DNaseI und einem Kühlen auf 4°C bis zur weiteren Verwendung.

Mittels Gel-Elektrophorese in einem 3%igen Agarose-Gel wird die Länge der entstandenen Fragmente bestimmt. Die optimale Länge ist 50-300bp.

Es folgt eine Kopräzipitation der Sonde mit 20µg COT-1-DNA mit 60µl Wasser, 20µl 5M Kalium-Acetat pH 5,2 und 500µl 96% Ethanol über Nacht bei -20°C. Nach Zentrifugation und Entfernen des Überstandes wird die Sonde getrocknet und in 4µl TE-Puffer gelöst.

### 2.2.12.4 Fluoreszenz in-situ Hybridisierung

#### 2.2.12.4.1 FISH an Chromosomenpräparaten aus Lymphozyten: Sondentest

Zur Überprüfung des Bereiches an dem die Sonde hybridisiert, wird sie zunächst auf einem Blutpräparat erprobt.

Die Blutpräparate werden in 37°C 2xSSC vorgewärmt, mit 0,05µg Pepsin/ml 0,01 N HCl bei 37°C angedaut, in 1% Paraformaldehyd in PBS fixiert und in einer aufsteigenden Ethanolreihe dehydriert.

0,9µl der Sonde, 0,9µl Aqua bidest und 0,5µl D10Z1 werden mit 7,7µl Hybrisol VI und mittels vorgewärmter Deckgläser (24x16 mm) auf das Präparat gegeben, mit Fixogum versiegelt. Nach Trocknen des Fixogums werden die Präparate bei 72°C 5 min denaturiert.

Die Hybridisierung erfolgt in einer feuchten Kammer bei 37°C über ein bis zwei Tage.

Das Waschen erfolgt in 50% Formamid/2xSSC 10 min bei 42°C und anschließend in 2xSSC.

Die D10Z1 (und ggf. die Digoxigenin-markierte Sonde) wird mittels Antikörper detektiert (s.o.), das Präparat wird gegengefärbt und mit Antifade eingedeckt.

Bei geeigneten Sonden sollten nur am p-Arm des Chromosoms 10 und am Zentromer des gleichen Chromosoms Signale sichtbar sein. Ist die Sonde nicht ausreichend verkürzt, sind um die Chromosomen große Punkte zu sehen.

#### 2.2.12.4.2 Herstellen und Vorbehandlung der Schnitte

Die Schnitte wurden in der Pathologie der FSU Jena von Frau Susanne Köllner angefertigt. Das Aufziehen der Schnitte erfolgt im kalten Wasser. Auf dem silanisierten Objektträger liegende Schnitte werden zum Strecken kurz in 50°C warmes Wasser gehalten.

Am besten eignen sich 5µm dicke Schnitte, da die Kerne dann im Bild nicht überlappen, die Schnitte gut am Objektträger haften und die Zahl der angeschnittenen Kerne so gering wie möglich gehalten wird.

Die Schnitte werden im Hybridisierungssofen über Nacht bei 56°C getrocknet.

#### Vorbehandlung

##### *Lösungen:*

20x SSC (Sodium Saline Citrate)

Die Interphasen-FISH an Paraffinschnitten wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Zum Entfernen des Paraffins werden die Objektträger für 20-25 min in Xylol gestellt, das Xylol wird in 96% Ethanol für etwa 5 min abgespült. Auf der Heizplatte trocknen, bis der Schnitt weiß wird.

Zum Vorbehandeln des Gewebes folgt eine 20 minütige Ansäuerung in 0,2 N HCl, anschließend wird in destilliertem Wasser (1 Minute) und 2x SSC, pH 7,0 (5 min) gespült. Zur Vorbereitung auf den proteolytischen Andau muß das Gewebe für 10 min bei 80°C in Natriumrhodanit inkubieren, in destilliertem Wasser und 2x SSC wird wie oben beschrieben gespült. Diese Schritte erleichtern den Zugang des Enzyms an die Peptidbindungen.

Für den Protease K-Andau 100µg Protease K pro 1ml 1M Tris HCl pH 8,0 mischen. 1ml dieser Lösung auf den flachen Objektträger tropfen und in einer feuchten Kammer bei 37°C inkubieren. Eine Inkubationsdauer von 50min hat sich als optimal

herausgestellt. Die Protease wird in 2x SSC entfernt. Der Schnitt wird dann wieder auf der Heizplatte getrocknet.

Die Fixierung erfolgt in 4% Paraformaldehyd in PBS (phosphate buffered saline), gefolgt von 5 min Spülen in 2x SSC und erneutem Trocknen des Schnittes.

#### 2.2.12.4.3 FISH mit einer kommerziellen Zentromersonde

Antifade:

10mg p-Phenylendiamin pro ml PBS

9 Volumenteile Glycerol pro Volumenteil PBS/ p-Phenylendiamin-Lösung

Die vorbehandelten Gewebeschnitte werden im 37°C-Wasserbad in 2x SSC 30 min vorgewärmt und in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70, 80, 96%) dehydriert. Die Denaturierung erfolgt in 70% Formamid in 2x SSC bei pH 7,0 im Wasserbad bei 74°C für 2 min. Anschließend wird in eiskalter aufsteigender Ethanolreihe (70, 80, 96%) erneut dehydriert, um ein Reannealing zu vermeiden, und die Schnitte werden luftgetrocknet.

Die Sonde wird 5 min bei 37°C vorgewärmt, pro Schnitt werden 0,5µl auf 10µl Hybrisol VI pipettiert und bei 72°C denaturiert. Die Sonde sollte zur Vermeidung des Reannealings sofort auf Eis gestellt werden und kann dort bis zum Gebrauch verbleiben.

Die 10µl werden auf den Schnitt pipettiert, mit einem Deckglas abgedeckt und mit Fixogum versiegelt. Die Hybridisierung erfolgt in einer feuchten Kammer 37°C über Nacht mindestens 15 Stunden.

Das stringente Waschen zur Entfernung von Fehlpaarungen erfolgt im 43°C-Wasserbad in 50% Formamid in 2x SSC pH 7,0 für 15 min. Anschließend wird 8 min in 2x SSC bei 37°C gewaschen und in Spülpuffer (4x SSC; 0,2% Tween 20) oder PBD (phosphate buffered detergent) gespült.

Es folgt die Detektion mit dem Detektionskit. Pro Objektträger werden 30µl Fluoreszein-markierter Anti-Digoxigenin-Antikörper auf den flachliegenden Schnitt pipettiert und in einer feuchten Kammer bei 37°C unter einem Plastik-coverslip 5 min inkubiert. Zur Amplifikation werden jeweils 30µl Rabbit-Anti-Sheep und Fluoreszein-markierter Anti-Rabbit Antikörper jeweils 15 min bei 37°C nacheinander unter Plastik-



coverslip inkubiert. Zwischen den Inkubationen wird in Spülpuffer oder PBD bei Raumtemperatur gespült.

Die Gegenfärbung erfolgt in einer Lösung aus 500µl PBD oder Spülpuffer mit 0,1µg/ml Propidiumiodid und 0,1 µg/ml DAPI. Die Färbelösung wird auf den flachliegenden Objektträger pipettiert und 5 min bei RT inkubiert und mit destilliertem Wasser abgespült. Die Schnitte werden luftgetrocknet. Als Eindeckmittel wird Antifade verwendet. Es wird mit Fixogum aufgeklebt.

#### 2.2.12.4.4 Interphasen-FISH mit Sonden aus künstlichen Hefechromosomen

Die Schnitte werden wie für die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung mit der Zentromersonde vorbehandelt und denaturiert.

Es werden pro Schnitt 15,4µl Hybrisol VI, 2,3µl Wasser und 2,3µl Sonde gemischt, auf den Schnitt gegeben, mit einem Deckglas abgedeckt und versiegelt.

Die Hybridisierung erfolgt über 2 Tage. Die Detektion erfolgt wie in 2.4.7 beschrieben.

#### Auswertung/ Statistik der Interphasen-FISH

Es werden die Kerne ohne Signal, mit einem, zwei, drei oder mehr als drei Signalen ermittelt. Zwischen 50 und 200 Kerne werden pro Tumor oder CIN und Normalgewebe (sofern vorhanden und ausreichend hybridisiert) gezählt. Es werden nur solche Signalverteilungen herangezogen, in denen der Anteil der Kerne ohne Signal unter 15% liegt.

Dabei gelten folgende Kriterien:

Überlappende Kerne werden nicht gezählt, da die Zuordnung der Signale zu dem richtigen Kern nicht möglich ist und weitere Signale verdeckt sein können.

Sehr eng nebeneinanderliegende Signale (split points) werden als ein Signal gezählt, und auch diffuse Signale oder vergrößerte Signale werden als eines berücksichtigt.

Während des Auszählens wird fokussiert, um den Kern in allen Ebenen ansehen zu können.

Die Signalverteilungen für das gesunde Plattenepithel werden in Mittelwerte zusammengefaßt und die Standardabweichung wird bestimmt. Dieser Test ist anwendbar bei beliebig großem Stichprobenumfang (also jede Zahl untersuchter Kerne) mit diskreten oder stetigen Variablen. Er untersucht als Nullhypothese, dass die Verteilung der Stichprobe gleich der Normalverteilung ist.

Als Signifikanzschränke wird  $P < 0,05$  festgelegt. Dies ist in anderen Interphase-FISH-Studien die am Häufigsten verwendete Signifikanzschränke (Bulten et al. 1998, Hamon-Benais et al., 1996, Baretton et al., 1998, Zitzelsberger et al, 1994, Perry et al., 1997).

### **3 Ergebnisse**

#### **3.1 Zellkultur: Gewinnung von Metaphase-Chromosomen**

Um aus Biopsien oder Tumorgewebe Metaphase-Chromosomen zu erhalten, müssen sich ausreichend Zellen in der Teilung befinden. Die Zellen können mittels Colcemid in der Metaphase arretiert werden und auf Objektträger aufgetropft werden. An jeden Zelltyp müssen die Konzentration und die Inkubationszeit mit dem Colcemid angepaßt werden. Je länger eine Zellteilung dauert, um so länger ist auch die Inkubationszeit. Allerdings nimmt auch mit der Inkubationsdauer die Qualität der Metaphasen ab, d.h. die Chromosomen kondensieren sehr stark was sich negativ auf die Auflösung auswirkt.

Für die SKY-FISH sollten pro Fall mindestens 10 gute Metaphasen vorhanden sein.

Die Schwierigkeiten in der Kultur bestanden in erster Linie in der Größe der Biopsien: Hier sind in den meisten Fällen zu wenige proliferierende Zellen vorhanden. Auch „sanftere“ Methoden der enzymatischen Vereinzelung der Zellen aus dem Zusammenhalt des Gewebes konnte die Zahl der adhärent wachsenden Zellen nicht ausreichend erhöhen. Zudem erwiesen sich die Fibroblasten in vielen Fällen als aktiver, so dass kleinste Kulturen von Keratinozyten sehr häufig überwachsen wurden.

Ein weiteres Problem bestand in der häufigen Kontamination der kleinen Biopsien. Aus der Scheidenflora verblieben nach dem Verdau des Gewebes häufig Bakterien oder Pilze in der Kultur. Dies machte jede weitere Kultur unmöglich.

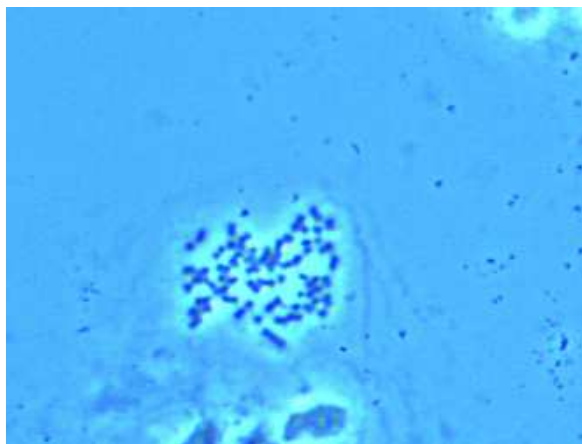
Auch konnten in den wachsenden Kulturen die wenigen Zellen, die auswuchsen, zu keinem ausreichend großen Klon expandiert werden, so dass keine Chromosomenpräparation möglich war.

#### **3.2 Direktpräparation des Gewebes**

Verschiedene dysplastische und Tumorgewebe wurden direkt aufgearbeitet. Dies bedeutet, dass die Zellen direkt ohne Zellkultur arretiert werden. Dabei wurde zur Arretierung der Metaphasen neben Colcemid alternativ auch der Phosphatase-Inhibitor Calyculin A verwendet (s. Abschnitt 3.3.1.).

Durch Direktpräparation des Gewebes konnte weder mittels Colcemid noch mittels Calyculin A eine ausreichende Anzahl an Metaphasen gewonnen werden.

Die Chromosomen einzelner Metaphasen waren i.d.R. sehr kurz und nicht gut gespreitet (Abb.3-1). Es fanden sich außerdem viele Zellfragmente auf dem Objektträger. Somit waren diese Präparate aufgrund der geringen Anzahl an Metaphasen und der ungenügenden Qualität nicht für eine SKY-FISH verwendbar.



**Abbildung 3-1 Metaphase aus einer Direktpräparation**

Die Präparate wurden für eine spätere Anwendung (z.B. in der Interphasen-FISH) aufbewahrt.

### **3.3 Kurz-und Langzeitkultur der Gewebe**

Eine Kurzzeitkultur zeichnet sich durch eine Dauer von wenigen Tagen aus. Maximal 14 Tage wird eine solche Kultur gehalten. Sie hat den Vorteil, dass in-vitro keine Vielzahl an Veränderungen entstehen oder artifizielle Wachstumsvorteile zum Überwachsen eines Klons führen können. In der vorliegenden Studie dauerte es jedoch meist länger, bis sich überhaupt Keratinozyten in der Kultur zeigten. Daher wurden die Kulturen bei Bedarf auch länger geführt, bis eine ausreichende Menge an Zellen ernten ließen. Die Abbildung 3-2 zeigt eine Metaphase nach Kurzzeitkultivierung und Arretierung durch Colchicin.

Mittels Langzeitkultur konnten Zellen aus 2 Tumoren so weit expandiert werden, dass sie für die SKY-FISH ausreichend Metaphasen brachten. Sie werden im folgenden als pt238/KE und 19/03 bezeichnet. Eine Kultur normaler Vorhautkeratinozyten (im Folgenden als FK-04-15 bezeichnet) wurde als Kontrolle verwendet.

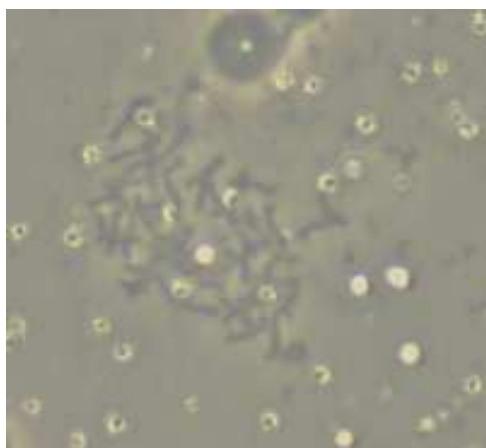
#### **3.3.1 Calyculin A**

Da die Verwendung von Colcemid auch in Kulturen nicht zu einer ausreichenden Zahl von Metaphasen führte, wurde zur Induktion einer größeren Anzahl von Metaphasen

wurde Calyculin A verwendet. Es inhibiert Phosphatasen. Da derartige Enzyme den Arrest der Mitose an den Kontrollpunkten des Zellzyklus vermitteln, ist ihre Inhibition mit einer Aufhebung dieser Kontrollen verbunden, so dass die Zellen die Kondensation der Chromosomen einleiten. Calyculin A ist daher auch als Cancerogen bekannt. Es findet seine Verwendung als Induktor von „premature condensed chromosomes“ (PCC). Weitere Phosphatase-Inhibitoren sind z.B. Okada-Säure und 2-Aminopurin. Letzteres wirkt nicht als Enzyminhibitor, sondern es ist ein Purin-Analog das auf mehrere Checkpoints wirkt. Es bringt daher auch Zellen in der G2-Phase in die Chromosomenkondensation (Andreassen et al., 1992).

Nach einstündiger Inkubation mit 80nM Calyculin A (nach Begg et al., 2002) konnte sowohl in den verwendeten HPK-Zelllinien als auch bei den primären Kulturen und den langsam wachsenden Keratinozyten eine große Zahl von Metaphasen induziert werden. Anders als nach Colcemid-Einwirkung lösen sich die Zellen unter Einwirkung von Calyculin A von der Wachstumsfläche und können sofort abzentrifugiert werden. Bei der Präparation hat sich als hypotone Lösung 1% KCl bei einer Einwirkzeit von 45 Minuten als effektiv erwiesen.

Für langsam wachsende und kleinere Zellkulturen (z.B. 25cm<sup>2</sup>-Flaschen) ist die Anwendung von Calyculin A zur Induktion von Chromosomen ideal. Es wurde in allen primären und in den meisten HPK-Zelllinien verwendet.



**Abbildung 3-2 Metaphase aus einer Kurzzeitkultur**

### **3.4 SKY-FISH**

Die Anwendung der SKY-FISH bedingt in erster Linie gut voneinander getrennte Chromosomen, die einander nicht überlappen dürfen. Auch sehr nah aneinander liegende Chromosomen haben zur Folge, dass sich die Farben der Sonden mischen oder

[illegible]

### 3.4.2 Ergebnisse Keratinozyten

Als Kontrolle wurden normale Keratinozyten mit dem SKY-Sondenmix hybridisiert. Diese Keratinozyten sind nicht transfiziert und wurden aus einer Vorhaut (Fallnummer: FK04-15) gewonnen. Es wurden Metaphasen der 4. Passage untersucht. Die Kultur konnte bis zur Passage 10 weitergeführt werden, bevor der Großteil der Zellen seneszent und die Kultur verworfen wurde.

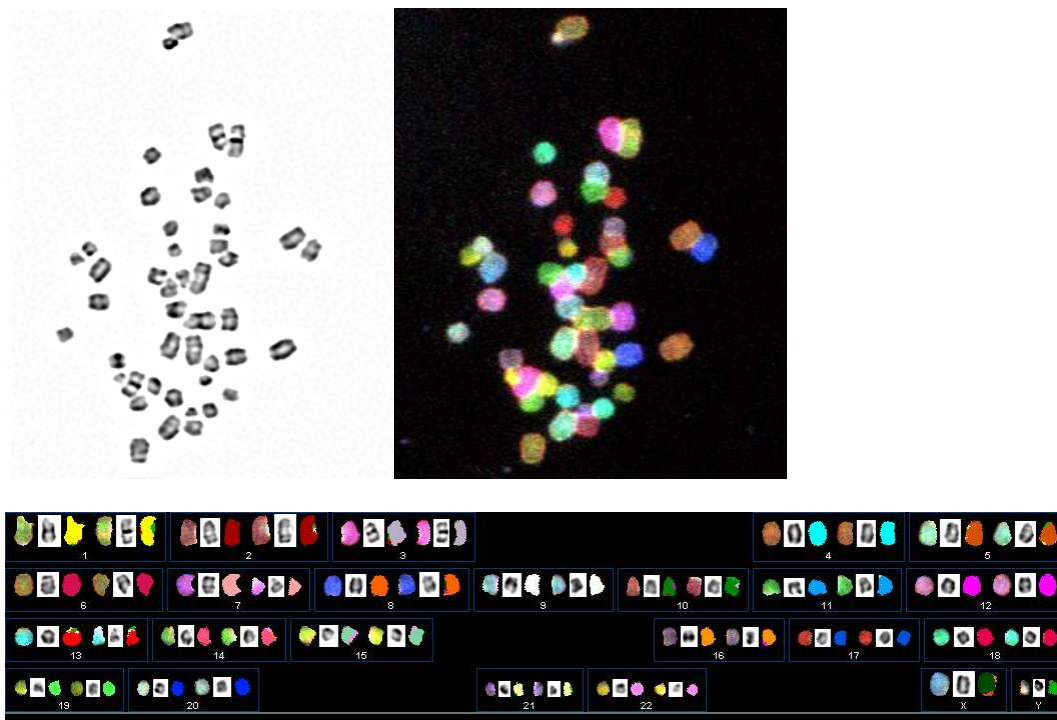
Auf zwei Objektträgern fanden sich 29 auswertbare Metaphasen. Eine Auflistung der gefundenen Aberrationen ist in der Tabelle 3-2 zu finden.

Hiervon weisen 9 Metaphasen keine, vier weitere lediglich 1 bis 2 numerische Aberrationen auf. Zählt man diese vier Metaphasen ebenfalls als „unverändert“, sind 13/29 Metaphasen (44,8%) normal (s. Anhang). Ein Beispiel für eine normale Metaphase ist in der Abbildung 3-3 gezeigt. Das Karyogramm wird in Abbildung 3-4 noch einmal vergrößert gezeigt.

**Tabelle 3-2 Karyotyp der Kultur FK04-15**

Kultur	Modalzahl	Aberrationen
FK04/15	40-92	-1 [1], -2 [2], +2 [1], der(2)del(2) [1], +3 [2], der(3)del(3) [2], der(3)del3p26.2-qter) [1], -4 [2], +4 [3], der(4)del(4) [1], +5[3], der(5)del(5) [3], +6 [1], 2x +6 [1], -7 [1], -8[1], -9 [2], +9 [5], 3x +9 [1], der(9)del(9) [1], -10[5], der(10)del(10)a [1], der(10)del(10)b [1], -11[2], +11 [2], der(11)del(11) [1], -12 [3], +12 [3], -13 [1], +13 [2], -14 [1], +14 [2], -15[3], +15 [1], 2x +15 [1], -16 [1], +16 [2], 2x +16 [1], der(16)del(16) [1], -17 [1], 2x -17 [1], +17 [1], -18 [6], der(18)i(18?)1], der(18)i(18q) [1], -19 [4], 2x -19 [1], +19 [1], der(19)del(19) [1], -20 [4], +20 [3], -21 [3], -22 [6], 2x -22 [1], +22 [1], der(22)del(22) [1], -X [1], -Y [1], +Y [1]

11 Metaphasen weisen insgesamt 14 strukturelle Aberrationen auf. 9 Metaphasen weisen jeweils eine strukturelle Aberration auf. Nur zwei der Aberrationen kommen häufiger als ein Mal vor: ein Derivatvchromosom 5 (3 Metaphasen) und ein deletiertes Chromosom 3 (3 Metaphasen).



**Abbildung 3-3: SKY an normalen Keratinozyten: links oben: DAPI-Aufnahme, rechts oben: SKY, unten: Karyogramm**

4 Metaphasen weichen in der Polyploidie sehr stark vom normalen Karyotyp ab, darunter vier nahezu tetraploide (mit 85, 90 und 92 Chromosomen) und eine nahezu triploide (mit 66 Chromosomen) Metaphase. Die Tabelle 3-3 zeigt, dass jedes Chromosom von Aberrationen betroffen sein kann. Zumeist handelt es sich um numerische Aberrationen.

**Tabelle 3-3: Übersicht über die chromosomalen Aberrationen/ Karyotyp der normalen Keratinozyten**

Chromosom	Art der Aberration	Häufigkeit
<b>1</b>	-1	1
<b>2</b>	-2	2
	+2	1
	der(2)del(2)	1
<b>3</b>	+3	2
	der(3)del(3)	2
	der(3)del(3p2.6-qter)	1
<b>4</b>	-4	2
	+4	3
	der(4)del(4)	1



<b>Chromosom</b>	<b>Art der Aberration</b>	<b>Häufigkeit</b>
<b>5</b>	+5	3
	der(5)del(5)	3
<b>6</b>	+6	2
<b>7</b>	-7	1
<b>8</b>	-8	1
<b>9</b>	-9	2
	+9	8
	der(9)del(9)	1
<b>10</b>	-10	5
	der(10)del(10)a	1
	der(10)del(10)b	1
<b>11</b>	-11	2
	+11	2
	der(11)del(11)	1
<b>12</b>	-12	3
	+12	3
<b>13</b>	-13	1
	+13	2
<b>14</b>	-14	1
	+14	2
<b>15</b>	-15	3
	+15	1
<b>16</b>	-16	1
	+16	2
	der(16)del(16)	1
<b>17</b>	-17	2
	+17	1
<b>18</b>	-18	6
	der(18)i(18)q	1
	der(18)del(18)	1
<b>19</b>	-19	+
	+19	2
	der(19)del(19)	1
<b>20</b>	-20	4
	+20	4

Chromosom	Art der Aberration	Häufigkeit
<b>21</b>	-21	3
<b>22</b>	-22	7
	+22	1
	der(22)del(22)	1
<b>X</b>	-X	1
<b>Y</b>	-Y	1
	+X	1

Zusammenfassend lassen sich vier Klone erkennen, wobei der normale Karyotyp am stärksten vertreten ist.

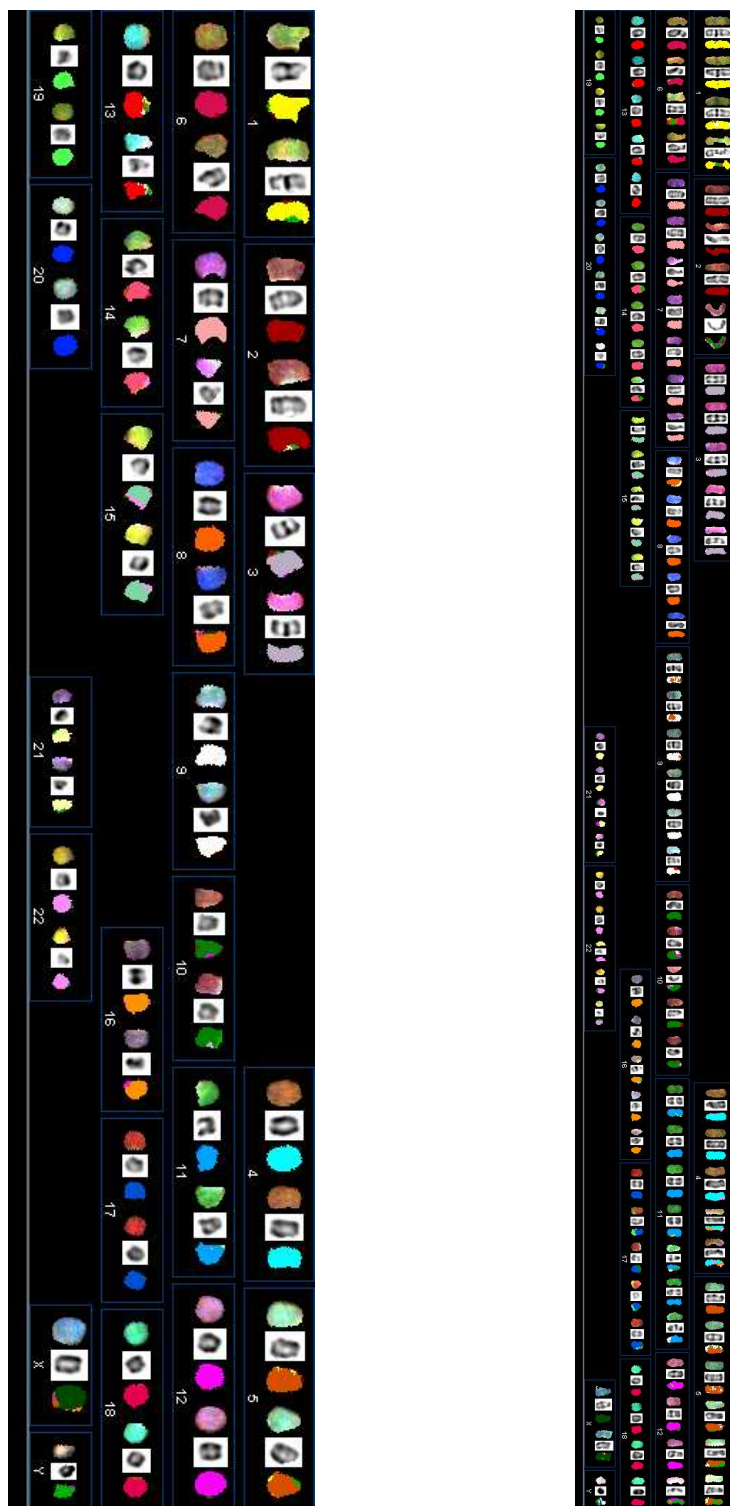
### 3.4.3 Ergebnisse HPK-Zellen allgemein

Die HPK-Zellen (human papillomavirus immortalized keratinocytes) wurden in möglichst frühen Passagen mittels SKY analysiert. Für die Gewinnung der Metaphasen war die geringe Teilungsrate der Zellen limitierend. Am deutlichsten zeigte sich dieses Problem bei HPKII-2, von denen nur 2 Passagen für die SKY-FISH zur Verfügung standen. In dieser Kultur setzte nach etwa 20 Passagen ein Wachstumsstopp ein, obwohl diese Transfektion bereits eine immortale Zelllinie hervorgebracht hat. In den anderen Zelllinien (HPKIA-2, HPKIII-2 und HPKV-2) konnten aus mehreren Passagen Metaphase-Präparate für die SKY-FISH gewonnen werden, wenn zumeist auch erst in späterer Passage.

#### 3.4.3.1 HPKIA-2

Die HPKIA-2-Zellen wuchsen nach Passage 20 sehr schnell, die Teilungsrate wurde schnell optimal für Präparation von Metaphasen.

Die HPKIA-2-Zellen wurden in den Passagen 18, 26 und 37 untersucht. Alle drei Passagen werden von polyploiden Zellen dominiert. In Passage 18 sind drei von 13 Metaphasen triploid, fünf sind tetraploid und fünf sind pentaploid. In Passage 26 sind von 21 Metaphasen zwei triploid, fünf tetraploid, acht sind pentaploid, 2 sind hexaploid und eine ist octaploid. In den verbleibenden vier Metaphasen fanden sich 195 und mehr Chromosomen: 198, 211 und 291 Chromosomen. In Passage 37 ist diese extrem hohe Zahl an Chromosomen nicht mehr zu finden. Von 42 untersuchten Metaphasen ist eine diploid (2,3%), drei sind triploid (7,1%), 14 tetraploid (33%) und 24 (57%) pentaploid. Ein Beispiel für eine Metaphase zeigt die Abbildung 3-4.



**Abbildung 3-4** Beispiel für je eine Metaphase aus normalen Keratinozyten (links, ohne Aberrationen) und HPKIA-2 (rechts)

Die Tabelle 3-4 zeigt eine Zusammenfassung aller untersuchten Metaphasen mit Modalzahlen und auftretenden Aberrationen einschließlich ihrer Häufigkeit.

Tabelle 3-4 Karyotyp HPKIA

Kultur/ Passage	Modalzahl	Aberrationen
HPKIA p18	59-114	-1 [7], 2x -1 [2], der(1)t(Y;1)? [2], -2 [6], 2x -2 [2], 3x -2 [1], 2x +2 [2], der(2)del(2) [2], -3 [3], +3 [1], -4 [4] 2x -4 [1], +4 [2], -5 [1], +5 [5], 2x +5 [4], 4x +5 [1], der(5)del(5) [1], der(5)t(5;18) [1], -6 [7], 2x -6 [2], +6 [1], der(6)del(6q) [3], +7 [4], 2x +7 [6], 3x +7 [1], der(7)t(7;13) [2], der(7)del(7q) [1], 2x -8 [1], +8 [2], 2x +8 [2], -9 [1], +9 [8], 2x +9 [2], der(9)del(9q?) [1], 2x der(9)del(9q?) [1], -10 [5], 2x -10 [1], 3x -10 [1], 4x -10 [1], +10 [1], der(10)del(10q?) [4], 2x der(10)del(10q?) [1], der(10)t(10;13) [1], -11 [1], +11 [3], 2x +11 [4], 3x +11 [3], der(11)t(5;11) [1], der(11)del(11q) [1], -12 [2], 2x -12 [1], +12 [2], der(12)t(10;12) [1], der(12)t(11;12) [1], -13 [3], 2x -13 [1], +13 [5], -14 [1], 2x -14 [1], +14 [3], 2x +14 [1], der(14)t(13;14) [1], der(14)del(14) [1], -15 [2], 2x -15 [2], +15 [2], 2x +15 [1], -16 [1], +16 [4], 3x +16 [1], der(16)t(16;20) [1], der(16)del(16?) [1], -17 [2], 2x -17 [1], +17 [6], 2x +17 [1], der(17)t(17;19) [2], -18 [5], 2x -18 [1], -19 [5], 2x -19 [1], +19 [2], 2x +19 [1], -20 [1], 2x -20 [1], +20 [3], 2x +20 [2], 3x +20 [1], -21 [5], 2x -21 [4], 3x -21 [1], -22 [4], 2x -22 [3], +22 [2], -X [1], +X [1], -Y [1], +Y [1], der(X)del(X) [1], der(X)t(X;13) [1]
HPKIA-2 p26	67-211	-1[10], 2x -1 [5], 3x -1 [2], +1 [1], -2 [6], 2x -2 [6], 3x -2 [2], der(2)del(2) [2], der(2)t(2;10) [1], -3 [3], 2x -3 [2], 3x -3 [1], +3 [6], 2x +3 [1], der(3)t(3;7) [1], der(3)t(3;10) [1], -4 [6], 2x -4 [3], +4 [2], 2x +4 [1], 4x +4 [1], der(4)t(3;4) [1], der(4)del(4) [2], 2x der(4)del(4) [2], -5 [2], 2x -5 [1], +5 [13], 2x +5 [2], 3x +5 [2], 4x +5 [1], der(5)t(5;22) [2], der(5)t(5;9) [1], der(5)del(5p) [2], der(5)del(5q) [1], -6 [6], 2x -6 [4], 3x -6 [1], 4x -6 [1], 5x -6 [1], +6 [1], 2x +6 [1], der(6)dup(6) [1], -7 [1], +7 [8], 2x +7 [4], 3x +7 [2], 5x +7 [1], 7x +7 [1], der(7)t(7;22) [1], der(7)dup(7) [1], -8 [1], 2x -8 [3], 5x -8 [1], +8 [4], 3x +8 [1], der(8)del(8q) [1], der(8)t(8;11) [1], -9 [1], 2x -9 [1], +9 [8], 2x +9 [6], der(9)del(9) [2], 2x der(9)del(9) [3], -10 [4], 2x -10 [1], 3x -10 [1], 5x -10 [2], +10 [3], 2x +10 [2], der(10)del(10q) [6], 2x der(10)del(10q) [1], der(10)t(10;12) [1], der(10)del(10p) [1], der(10)t(3;10) [1], -11 [1], 3x -11 [1], 2x +11 [8], 3x +11 [4], 4x +11 [5], der(11)del(11) [4], -12 [7], 2x -12 [2], 3x -12 [3], +12 [1], 2x +12 [2], 3x +12 [1], 4x +12 [1], der(12)del(12) [3], der(12)t(2;12) [3], der(12)t(3;12) [5], -13 [3], 2x -13 [2], 3x -13 [1], +13 [3], 2x +13 [1], 3x +13 [2], -14 [5], 2x -14 [1], +14 [3], 2x +14 [1], der(14)t(14;15) [1], -15 [4], 2x -15 [2], +15 [3], 2x +15 [1], -16 [7], 4x -16 [1], +16 [4], 2x +16 [1], -17 [4], 2x -17 [2], 3x -17 [1], +17 [2], 3x +17 [1], der(17)t(17;19) [10], der(17)del(17) [2], 2x der(17)del(17) [1], -18 [8], 2x -18 [2], 3x -18 [2], 2x +18 [2], -19 [10], 2x -19 [3], 3x -19 [3], +19 [2], 2x +19 [1], -20 [2], 3x -20 [1], 5x -20 [1], +20 [7], 2x +20 [1], 3x +20 [2], 4x +20 [1], der(20)dup(20) [1], -21 [11], 2x -21 [5], 3x -21 [1], +21 [1], -22 [6], 2x -22 [3], +22 [2], 2x +22 [1], 5x +22 [1], -X [2], 2x +X [1], der(X)del(X) [1], der(X)t(X;5) [1], -Y [3], mar1 [2], 2x mar1 [2]

Kultur/ Passage	Modalzahl	Aberrationen
HPKIA-2 p37	41-109	-1 [18], 2x -18 [6], +1 [1], -2 [19], 2x -19 [1], der(2)del(2) [2], -3 [4], +3 [8], der(3)t(3;20) [5], der(3)del(3?) [1], der(3)(ein Chromatid fehlt) [1], -4 [20], 2x -4 [4], +4 [3], der(4)del(4q) [2], der(4)del(4p) [1], -5 [2], 2x -5 [1], +5 [19], 2x +5 [4], 3x +5 [1], -6 [20], 2x -6 [2], der(6)tas(6;18) [1], +7 [12], 2x +7 [8], 3x +7 [3], 4x +7 [1], der(7)t(7;12) [22], 2x der(7)t(7;12) [2], der(7)t(7;8) [1], der(7)t(6;7)(?-pter) [1], -8 [2], +8 [5], 2x +8 [1], der(8)i(8q) [1], der(8)del(8pter-q?) [1], -9 [2], +9 [15], 2x +9 [5], der(9)t(7;9) [1], -10 [3], +10 [4], 2x +10 [1], der(10)del(10q) [7], 2x der(10)del(10q) [20], 3x der(10)del(10q) [2], +11 [19], 2x +11 [4], 3x +11 [1], -12 [7], 2x -12 [16], 3x -12 [1], 4x -12 [1], -13 [2], +13 [4], 2x +13 [2], der(13)t(13;14) [1], der(13)t(9;13) [1], -14 [10], +14 [5], der(14)t(14;15) [1], -15 [7], +15 [1], 2x +15 [1], 3x +15 [1], -16 [6], +16 [7], 2x +16 [1], -17 [6], 2x -17 [1], +17 [5], der(17;19) [35], 2x der(17;19) [2], -18 [19], 2x -18 [6], 3x -18 [1], -19 [21], 2x -19 [3], +19 [1], -20 [5], 2x -20 [1], +20 [17], 2x +20 [3], -21 [19], 2x -21 [5], +21 [1], -22 [16], 2x -22 [4], 3x -22 [1], +22 [1], -X [2], der(X)t(X;4) [1], -Y [7]

Weitere numerische Aberrationen sind sehr häufig. In allen drei untersuchten Passagen finden sich Verluste der Chromosomen 1 (9/13, 17/21, bzw. 34/42 Metaphasen) und 21 (9/13, 17/21, bzw. 35/42 Metaphasen). In der Tabelle 3-5 sind die häufigsten Veränderungen in den einzelnen Passagen gezeigt. Hierbei werden Verluste und Zugewinne auf die einzelnen Metaphasen bezogen, das heißt, es bleibt unberücksichtigt, dass in anderen Passagen vereinzelt auch das jeweilige gegenläufige Ereignis auftritt.

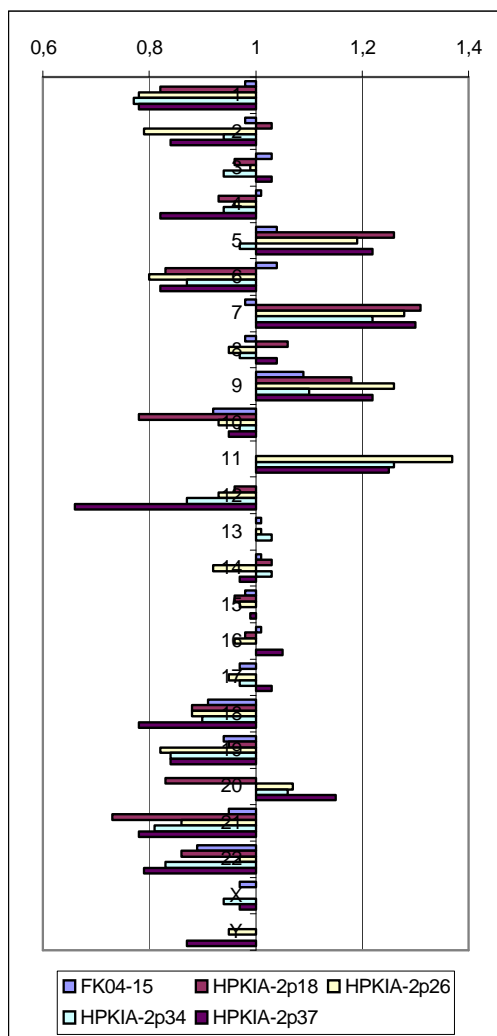
Der Verlust des gesamten Chromosoms 10 nimmt mit zunehmender Passagierung ab. In den späten Passagen geht allerdings der kurze Arm des Chromosoms 10 häufiger verloren (Tabelle 3-5).

Die weiteren Aberrationen haben mit fortschreitender Passagierung einen größeren Anteil erworben, oder sind stabil geblieben. Diese stabilen Veränderungen waren mit über 70% bereits in der ersten untersuchten Passage relativ häufig. Es handelt sich hierbei um den Verlust der Chromosomen 2 und 21, sowie um die Überrepräsentation des Chromosoms 7.

Tabelle 3-5 HPKIA-2: prozentuale Verteilung der häufigen Aberrationen

Chromosomenaberration	p18	p26	p37
<b>-1</b>	69,2%	81%	76,1%
<b>-2</b>	69,2%	66,6%	71,4%
<b>-4</b>	38,5	42,9	76,2
<b>-6</b>	69,2%	61,9%	76,2%
<b>-10</b>	61,5%	38,1%	9,5%
<b>-12</b>	23%	57,1%	88,1%
<b>-18</b>	46,2%	57,1%	78,6%
<b>-19</b>	46,2%	76,2%	71,4%
<b>-21</b>	76,9%	85,7%	83,3%
<b>-22</b>	53,4%	42,9	78,6%
<b>+5</b>	76,9%	85,7%	83,3%
<b>+7</b>	84,6%	76,2%	81%
<b>+11</b>	76,9%	80,95%	88,1%
<b>+20</b>	46,2%	52,4%	69%
<b>der(10)</b>	38,5%	33,3%	97,6%
<b>der(17)</b>	15,4%	47,6%	92,9%
<b>der(7)t(7;12)</b>	0	0	75%

Die Einzige in später Passage (p37) erworbene Veränderung ist struktureller Natur. Dies ist eine Translokation unter Beteiligung der Chromosomen 7 und 12 mit einem zentromernahen Bruchpunkt. Eine weitere strukturelle Aberration ist ein der(17), welches mit dem Fortschreiten der Passagierung gehäuft auftritt (Tabelle 3-5).



**Abbildung 3-5 Verluste und Zugewinne in der Zelllinie HPKIA-2 mit fortschreitender Passagierung im Vergleich zu primären Keratinozyten**

Die Abbildung 3-5 setzt auch die Polyploidie mit in das Verhältnis der Verluste und Zugewinne. Hierfür wurde zunächst die Zahl der Chromosomensätze in den untersuchten Metaphasen gezählt und errechnet, wie häufig jedes Chromosom in ausschließlich normalen Metaphasen vorhanden wäre. Anschließend wurde die Zahl der tatsächlich verlorenen oder überrepräsentierten Chromosomen ermittelt. Ist also beispielsweise ein Chromosom in einer tetraploiden Metaphase sechsfach vorhanden, so werden der absoluten Zahl von Chromosomen zwei hinzu gezählt. Zuletzt wird die tatsächliche Zahl des jeweiligen Chromosoms mit der theoretischen Zahl ins Verhältnis gesetzt. Bei Werten, die größer als 1 sind, ist das Chromosom tendentiell überrepräsentiert, bei einem Wert kleiner als 1 ist es tendentiell unterrepräsentiert. Der Vorteil dieser Darstellungsweise ist, dass auch in unterschiedlichen Metaphasen gegensätzliche Ereignisse im Gesamtergebnis berücksichtigt werden und die Werte somit besser mit den Ergebnissen der CGH verglichen werden kann. Der Nachteil liegt

darin, dass diese Betrachtungsweise keine Sicht auf die strukturellen Veränderungen zulässt. Derivate des jeweiligen Chromosoms werden genauso gezählt wie intakte Chromosomen. Daher lassen sich diese Werte auch nicht komplett mit denen der CGH vergleichen. Diese Diagramme wurden für alle Zelllinien erstellt. Diese Darstellung beruht auf eigenen Überlegungen, sie wurde dann jedoch ähnlich in der Veröffentlichung von Kimura und Mitarbeitern (Kimura et al., 2004) gefunden. Der Unterschied besteht darin, dass die Verluste und Gewinne, die in unterschiedlichen Tumoren für ein Chromosom gefunden wurden, nicht gegeneinander verrechnet wurden, sondern einzeln dargestellt werden.

#### 3.4.3.2 *HPKII-2*

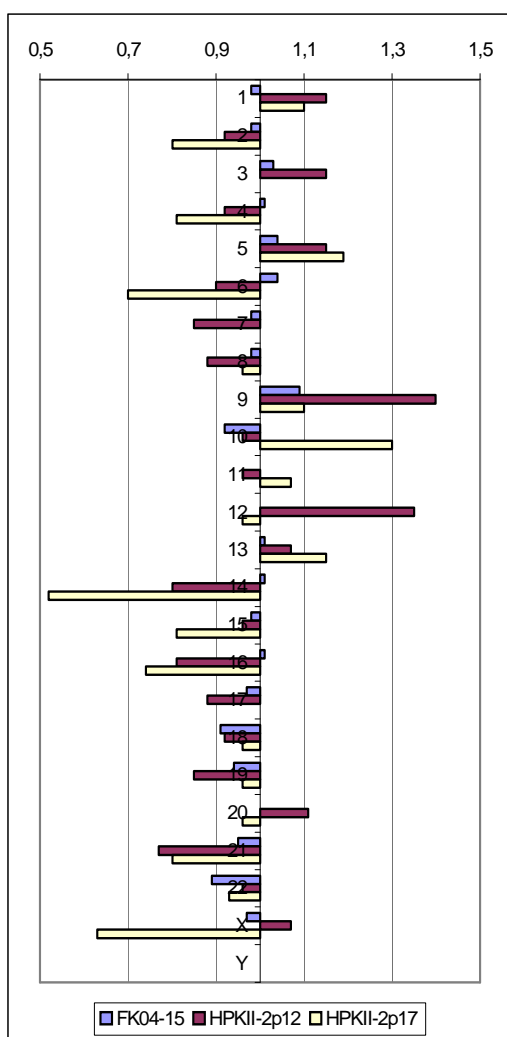
Die HPKII-2-Zellen wurden mit Hilfe eines Feeder-Zell-Layers kultiviert, da sie sonst nicht oder langsamer gewachsen wären. So war es möglich, aus dieser Zelllinie Präparate aus sehr frühen Passagen herzustellen. Der Hintergrund der Präparate fluoreszierte allerdings sehr stark (vermutlich durch Bindung der Sonden an den Zelldebris der Feeder-Zellen), wodurch die Farbqualität der Hybridisierung nicht optimal war. Der Zelldebris fluoresziert heller als die Chromosomen und lässt durch die Intensität die gewünschten Signale sehr blaß erscheinen, wodurch sie in der Aufnahme schlecht voneinander unterscheidbar sind. Eine schlechte farbliche Zuordnung der Chromosomen durch das Programm ist die Folge. Sind die Chromosomen dann zusätzlich sehr kurz, kann auch die DAPI-Bänderung wenig helfen, um Chromosomen zuzuordnen. Dies gilt in größerem Maße für ihre Derivate. Karyogramme konnten daher nur für 9 (Passage 12) bzw. 10 Metaphasen (Passage 17) erstellt werden.

Eine Übersicht über den Modalzahlbereich sowie alle auftretenden Aberrationen gibt die Tabelle 3-6.



Tabelle 3-6 Karyotypen HPKII-2

Kultur/ Passage	Modalzahl	Aberrationen
HPKII-2 p12	33-90	-1 [1], +1 [5], der(1)del(1)a [3], der(1)del(1)b [1], 2x der(1)del(1)b [1], -2 [4], +2 [2], der(2)del(2q) [1], der(2)del(2?) [1], der(2)t(2;7) [1], der(2)t(Y;2) [1], -3 [1], +3 [2], 3x +3 [1], der(3)del(3?) [1], -4 [2], 2x -4 [2], +4 [2], der(4)del(4p) [2], 2x der(4)del(4p) [1], 2x -5 [1], +5 [4], 2x +5 [1], der(5)del(5cen→ qter) [2], der(5)t(2;5) [1], -6 [3], 2x -6 [1], +6 [1], 2x +6 [1], der(6)del(6?) [1], der(6)t(4;6) [1], -7 [4], 2x -7 [1], +7 [1], -8 [3], der(8)i(8q) [5], 2x der(8)i(8q) [1], +9 [3], 2x +9 [2], 3x +9 [1], der(9)del(9) [1], -10 [2], 2x -10 [2], +10 [1], 4x +10 [1], der(10)t(10;14) [3], 2x der(10)t(10;14) [1], 3x der(10)t(10;14) [1], der(10)t(10;17) [1], der(10)del(10q) [1], -11 [3], +11 [2], +12 [3], 2x +12 [3], der(12)del(12q) [5], 3x der(12)del(12q) [1], -13 [3], +13 [1], 4x +13 [1], der(13)t(X;13) [1], der(13)t(13;16), [1], der(13)dup(13) [1], -14 [3], 2x -14 [2], 3x -14 [1], +14 [3], der(14)t(12;14) [1], der(14)i(14) [1], der(14)t(14;16) [1], der(14)t(5;14) [1], -15 [3], +15 [2], der(15)del(15) [1], -16 [5], der(16)del(16?) [1], der(16)dup(16?) [1], -17 [4], +17 [1], der(17)dup(17) [1], der(17)t(13;17) [1], -18 [2], 2x -18 [1], +18 [2], -19 [4], 2x -19 [1], +19 [2], +20 [3], der(20)t(16;20) [1], -21 [3], 2x -21 [2], +21 [1], 2x -22 [1], +22 [1], +X [1], der(X)t(X;18) [1], -Y [1], +Y [1]
HPKII-2 p17	39-86	+1 [2], 2x +1 [1], der(1)t(1;16;3) [1], der(1;16;4) [1], der(1)del(1?) [1], der(1)t(Y;1) [1], -2 [4], +2 [1], der(2)t(2;3) [1], der(2)t(2;16) [1], der(2)t(2;4) oder t(2;6) [2], 2x der(2)del(2?) [1], -3 [2], +3 [2], der(3)del(3?) [5], der(3)t(3;11)(p;p) [1], -4 [4], 2x -4 [1], +4 [1], der(4)del(4?) [2], der(4)t(4;12)[1], der(4)t(4;6) [1], +5 [3], 2x +5 [1], der(5)t(5;21) [1], -6 [4], 2x -6 [1], der(6)del(6?) [1], -7 [2], +7 [2], der(7)t(3;7) [1], der(7)t(7;8) [2], der(7)del(7?) [2], der(7)del(7p) [2], -8 [3], +8 [2], der(8)i(8q) [4], der(8)t(8;15) [1], 2x der(8)t(8;15) [1], der(8)del(8) [1], -9 [3], +9 [3], 3x +9 [1], -10 [1], 2x +10 [3], 3x +10 [1], der(10)t(10;14) [4], 2x der(10)t(10;14) [4], 3x der(10)t(10;14) [1], der(10)del(10q) [1], -11 [1], +11 [3], der(11)del(11?) [1], 2x der(11)del(11?) [1], -12 [4], +12 [1], 2x +12 [1], der(12)t(12;20) [1], der(12)del(12) [1], -13 [2], +13 [1], 2x +13 [1], 3x +13 [1], der(13)del(13?) [1], der(13)t(13;18) [1], der(13)t(13;19) [1], -14 [4], 2x -14 [3], 3x -14 [1], der(14)t(5;14;8) [1], -15 [3], 2x -15 [2], -16 [6], 2x -16 [1], +16 [1], -17 [2], 2x -17 [1], +17 [1], 3x +17 [1], der(17)t(Y;17) [1], der(17)del(17) [1], -18 [3], +18 [2], -19 [1], 2x-19 [1], +19 [2], -20 [2], 2x -20 [1], 3x +20 [1], -21 [5], -22 [2], +X [3], 2x +X [1], der(X)t(X;13) oder t(X;18) [1], der(X)del(Xq) [1]



**Abbildung 3-6 Verluste und Zugewinne in der Zelllinie HPKII-2 in fortschreitender Passagierung im Vergleich zu primären Keratinozyten**

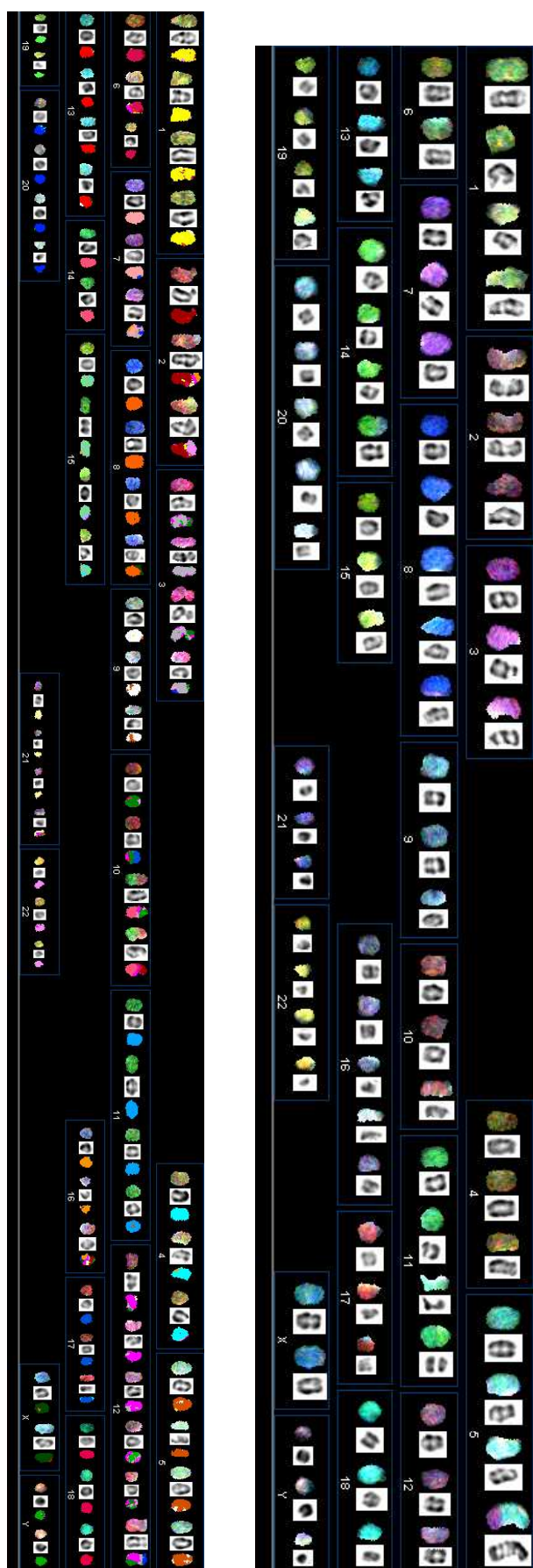


Abbildung 3-7 SKY-Karyogramm aus HPKII-2 p17 (links) und HPKIII-2 p44 (rechts)

In Passage 12 kommen numerische Veränderungen der Chromosomen 9 und 12 vor. Beide sind in der Zahl erhöht. Möglich ist, dass diese Chromosomen später wieder teilweise verloren gehen, da drei weitere Metaphasen auch einen Verlust dieses Chromosoms zeigen. In Passage 17 war nur noch der Zugewinn des Chromosoms 9 in 4 von 10 Metaphasen nachweisbar. In der 12. Passage ist auffällig, dass zwei der Metaphasen haploid ist, eine ist diploid, zwei sind tetraploid, die restlichen vier sind triploid. Außerdem ist eine große Heterogenität unter den Aberrationen festzustellen. Eine Translokation 10;14 wurde in der Passage 12 in fünf von neun Metaphasen und in Passage 17 in neun von zehn Metaphasen gefunden.

**Tabelle 3-7 HPKII-2, Verteilung der häufigsten Aberrationen**

<b>Chromosomen-aberration</b>	<b>p12</b>	<b>p17</b>
<b>-4</b>	3/9 (33,3%)	5/10 (50%)
<b>-6</b>	4/9 (44,4%)	5/10 (50%)
<b>-7</b>	5/9 (55,6%)	2/10 (20%)
<b>-14</b>	4/9(44,4%)	8/10 (80%)
<b>-16</b>	5/9 (55,6%)	7/10 (70%)
<b>-21</b>	5/9 (55,6%)	5/10(50%)
<b>+9</b>	6/9 (66,7%)	4/10 (40%)
<b>+12</b>	6/9 (66,7%)	2/10 (20%)
<b>+10</b>	2/9 (22,2%)	4/10 (40%)
<b>der(12)del(12q)</b>	6/9 (66,7%)	1/10 (10%)
<b>der(8)i(8q)</b>	6/9 (66,7%)	4/10 (40%)
<b>der(10)t(10;14)</b>	5/9 (55,6%)	9/10 (90%)

#### 3.4.3.3 HPKIII-2

HPKIII-2 wuchs nach einigen Passagen mit einer guten Teilungsrate. Ab Passage 37 konnten Metaphasen gewonnen werden.

Die HPKIII-2-Zellen sind in Passage 37 hauptsächlich triploid (12/21) und in Passage 44 tetraploid (12/16 Metaphasen). Die wenigsten Metaphasen sind diploid (1 von 21 Metaphasen in Passage 37), vereinzelt treten hepta- bzw. hexaploide Metaphasen auf.

Innerhalb von 7 Passagen nimmt die Häufigkeit der Chromosomen 11, 15 und 16 ab. Während in Passage 37 noch etwa 50% der Metaphasen Zugewinne der Chromosomen 11,15 und 16 aufwiesen, fanden sich in Passage 44 nur noch ca. 25% Metaphasen mit

Zugewinnen dieser Chromosomen. Die Tabelle 3-8 zeigt eine Zusammenfassung der gefundenen Karyotypen der Linie HPKIII-2.

**Tabelle 3-8 Karyotypen HPKIII-2**

Kultur/ Passage	Modalzahl	Aberrationen
HPKIII-2 p37	56-157	-1 [8], 2x -1 [2], +1 [1], der(1)del(1p→qter) [1], -2 [3], 2x -2 [1], +2 [5], 2x +2 [1], der(2)del(2) [2], +3 [7], 2x +3 [1], der(3)del(3) [1], 2x der(3)del(3) [1], -4 [7], 2x -4 [2], +4 [2], +5 [12], 2x +5 [1], 3x +5 [2], 4x +5 [1], der(5)t(3;5) [10], der(5)del(5?) [1], der(5)del(5q) [2], der(5)del(5p) [1], 2x der(5)del(5p) [1], der(5)t(1;5) [1], -6 [10], 2x -6 [3], 3x -6 [1], der(6)del(6q) [2], der(6)t(3;6) [5], -7 [6], 2x -7 [1], +7 [2], 2x +7 [2], der(7)del(7?) [3], 4x der(7)del(7?) [1], der(7)t(7;15) [1], +8 [6], 2x +8 [13], 3x +8 [2], der(8)del(8q) [1], der(8)t(8;21) [2], der(8)t(8;22) [1], -9 [3], 2x -9 [1], +9 [7], 2x +9 [2], der(9)del(9) [3], 2x der(9)del(9) [1], -10 [8], 2x -10 [3], 3x -10 [2], der(10)del(10q) [3], -11 [1], 2x -11 [1], 3x -11 [1], +11 [10], +12 [4], der(12)del(12) [3], der(12)t(10;12;2) [1], -13 [9], 2x -13 [3], 3x -13 [2], +13 [2], der(13)t(13;20) [1], -14 [7], 2x -14 [1], +14 [8], der(14)t(10;14) [1], der(14)del(14;14) [1], der(14)t(9;14) [1], -15 [2], 2x -15 [1], +15 [8], 2x +15 [3], der(15)t(15;22) [1], +16 [11], 2x +16 [2], der(16)del(16) [1], -17 [5], 2x -17 [1], +17 [5], 2x +17 [1], der(17)del(17) [1], 2x der(17)del(17) [1], -18 [5], 2x -18 [2], 4x -18 [1], +18 [1], -19 [3], 2x -19 [3], 3x -19 [1], +19 [1], der(19)del(19) [1], +20 [7], 2x +20 [9], 3x +20 [2], der(20)del(20?) [1], -21 [7], 3x -21 [1], +21 [2], 2x +21 [1], der(21)t(21;21) [2], der(21)t(21;22) [1], -22 [5], +22 [6], 2x +22 [2], der(22)t(22;22) [3], +X [2], 2x +X [1], 3x +X [1], der(X)del(X) [1], +Y [2], 2x +Y [1], mar(1) [1]
HPKIII-2 p44	64-159	-1 [13], der(1)del(1) [3], der(1)t(1;16) [1], der(1)t(1;3) [1], -2 [5], +2 [2], der(2)del(2) [2], -3 [8], +3 [3], der(3)del(3) [1], -4 [12], 2x -4 [1], der(4)del(4) [2], -5 [1], +5 [1], der(5)t(5;9) [2], der(5)t(5;18) [1], der(5)t(3;5) [6], -6 [8], 2x -6 [7], 4x -6 [1], der(6)t(3;6) [1], der(6)t(2;6) [1], -7 [13], der(7)t(7;10) [1], -8 [1], +8 [13], 2x +8 [2], -9 [4], 2x -9 [1], +9 [3], 2x +9 [2], der(9)del(9) [4], der(9)t(3;9) [1], -10 [10], 2x -10 [1], 4x -10 [1], +10 [1], der(10)del(10p) [2], 2x der(10)del(10p) [1], -11 [2], +11 [4], der(11)del(11) [2], -12 [10], 2x -12 [1], +12 [1], der(12)del(12) [1], -13 [8], 2x -13 [5], 3x -13 [1], +13 [1], -14 [3], 2x -14 [2], +14 [4], der(14;10) [1], der(14)t(9;14) [1], -15 [4], +15 [5], -16 [2], 2x -16 [2], +16 [3], der(16)del(16) [1], -17 [6], -18 [12], 2x -18 [1], -19 [7], 2x -19 [4], +19 [2], +20 [8], 2x +20 [4], 3x +20 [1], -20 [1], -21 [6], +21 [2], +22 [2], 2x +22 [1], der(22)t(15;22) [1], +X [2], der(X)del(X) [1], -Y [3], +Y [3]

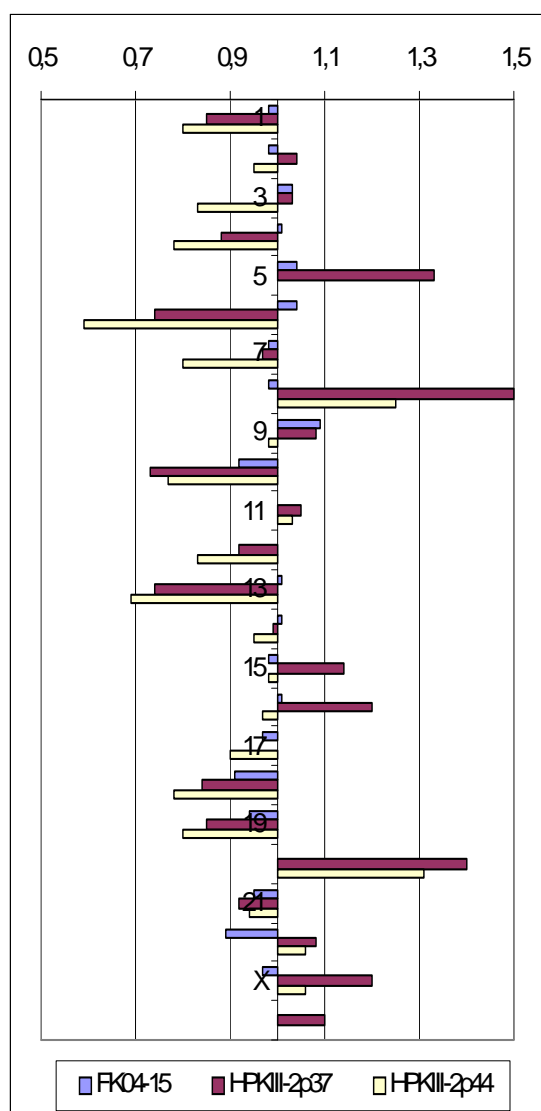
Gleichbleibend vorhanden ist die Überrepräsentation des Chromosoms 20, alle weiteren in Tabelle (3-9) beschriebenen Aberrationen nehmen von Passage 37 zu Passage 44 in ihrer Häufigkeit zu.

Chromosom 5 liegt in der Passage 37 als Derivat (Translokation mit Chromosom 3) in beiden untersuchten Passagen und, besonders in Passage 37, überrepräsentiert vor. Für beide Aberrationen sind die Zahlen mit fortschreitender Passagierung rückläufig.

Tabelle 3-9 HPKIII-2: Verteilung der häufigsten Aberrationen

Chromosomen-aberration	p37	p44
<b>-1</b>	47,6%	72,2%
<b>-3</b>	28,6%	56,3%
<b>-4</b>	42,9%	87,5%
<b>-6</b>	66,7%	100%
<b>-7</b>	33,3%	87,5%
<b>-10</b>	62%	75%
<b>-12</b>	33,3%	68,8%
<b>-13</b>	66,7%	87,5%
<b>-18</b>	38,1%	87,5%
<b>-19</b>	33,3%	68,8%
<b>+5</b>	76,2%	6,25%
<b>+8</b>	100%	93,8%
<b>+11</b>	47,6%	25%
<b>+15</b>	52,4%	18,8%
<b>+16</b>	62%	25%
<b>+20</b>	85,7%	87,5%
<b>der(5)t(3;5)</b>	47,6%	37,5%

Die Abbildung 3-8 zeigt die numerischen Aberrationen unter Einbeziehung der Ploidie. Hier sieht man einen deutlichen Unterschied für das Chromosom 1, das zwar in beiden Darstellungen Verluste aufweist, dieser jedoch unter Einbeziehen der Ploidie weniger stark ausgeprägt ist, weil in anderen (wenigen) Metaphasen das Chromosom 1 dupliziert ist. Diese Zahlen drücken jedoch denselben Trend aus.



**Abbildung 3-8 Verluste und Zugewinne in der Zelllinie HPKIII-2 in fortschreitender Passagierung im Vergleich zu primären Keratinozyten**

#### 3.4.3.4 HPKV-2

HPKV-2 wuchs vom Beginn der Kultur an mit einer hohen Teilungsrate.

31,4% (11/35) der untersuchten Metaphasen von HPKV-2 sind diploid. In Passage 25 sind von 26 Metaphasen lediglich 3 triploid. In Passage 32 sind von 15 Metaphasen 6 triploid (40%). Weitere 15 Passagen später (Passage 47) sind von 35 Metaphasen 20 triploid (57,1%). Tetraploidie gehört in allen 3 untersuchten Passagen zur Ausnahme. Dagegen sind triploide Zellen häufig.

Tabelle 3-10 Karyotypen von HPKV-2

Kultur/ Passage	Modalzahl	Aberrationen
HPKV-2 p25	43-90	-1 [1], der(1)t(1;10)(p36;?) [1], 3x +2 [1], -3 [1], der(3)t(3;11)(q10;q10) [22], der(3)t(3;15)(q10;15)del(3p?) [1], der(3)del(3) [1], der(3)t(3;7)(q10;q10) [1], -4 [4], der(5)t(1;5)(?;p11) [20], der(7)t(7;4;16)(p10;?;?) [1], -8 [1], der(8)del(8p?) [2], -9 [1], -10 [2], der(10)i(10q) [24], der(10)del(10p) [5], -11 [21], 2x -11 [1], +11 [1], -12 [1], -15 [2], 2x +16 [1], -19 [4], -21 [3], der(21)t(21;3;12) [1], -22 [5], 2x -22 [1], +22 [1], +X [1], -Y [2]
HPKV-2 p32	49-69	-1 [1], +1 [3], der(1)t(1;3) [12], -2 [1], +2 [6], -3 [8], 2x -3 [1], der(3)tas(3;12) [1], -4 [3], 2x -4 [1], +4 [4], 2x +4 [1], -5 [1], +5 [9], 2x +5 [1], der(5)del(5)a [1], der(5)del(5)b [2], der(5)t(5;9) [1], -6 [1], +6 [5], -7 [3], +7 [3], 2x +7 [1], +8 [11], 2x +8 [3], der(8)t(8;21) [1], -9 [1], 2x -9 [1], +9 [10], -10 [1], +10 [7], der(10)i(10q) [3], -11 [3], +11 [3], der(11)del(11) [1], -12 [9], +12 [1], -13 [8], 2x -13 [1], +13 [1], der(13)del(13) [1], -14 [1], 2x -14 [1], +14 [3], der(14)del(14) [1], -15 [7], 2x -15 [1], +15 [1], -16 [5], +16 [2], -17 [2], 2x -17 [1], +17 [4], -18 [3], +18 [4], 2x +18 [1], -19 [4], +19 [2], +20 [9], -20 [2], -21 [3], 2x -21 [1], +21 [2], -22 [6], +22 [2], 2x +22 [1], der(22)del(22) [1], -X [2], -Y [1], +Y [1], mar(1) [1]
HPKV-2 p47	32-105	-1 [8], 2x -1 [2], 3x -1 [1], +1 [5], der(1)t(1;3) [23], 2x der(1)t(1;3) [1], der(1)del(1q?) [2], -2 [4], 2x -2 [1], +2 [7], 2x +2 [2], 3x +2 [1], der(2)dup(2) [1], der(2)t(2;3) [1], der(2)t(2;13) [1], der(2)t(2;17) [1], der(2)t(2;15;19) [1], der(2)del(2) [1], -3 [16], 2x -3 [4], +3 [2], der(3)t(3;20) [1] der(3)t(3;11) [4], -4 [2], 2x -4 [5], +4 [3], +5 [13], 2x +5 [8], 3x +5 [2], der(5)del(5) [5], der(5)t(5;22) [1], der(5)t(5;17) [1], der(5)t(5;9)a [1], der(5)t(5;9)b [1], der(5)t(5;6) [1], -6 [5], 2x -6 [1], +6 [10], 2x+6 [1], der(6)t(6;14) [1], der(6)del(6p) [1], -7 [9], +7 [6], der(7)t(7;18) [21], 2x der(7)t(7;18) [1], der(7)t(7;20) [1], der(7)del(7) [2], -8 [2], +8 [20], 2x [9], der(8)i(8q) [2], der(8)del(8?) [2], der(8)t(8;9) [2], 2x -9 [1], 3x -9 [1], +9 [19], 2x +9 [5], 3x +9 [3], der(9)t(9;20) [1], der(9)del(9?) [2], der(9)t(9;2;16) [1], -10 [7], 2x -10 [1], +10 [2], der(10)t(5;10) [18], 2x der(10)t(5;10) [2], der(10)t(10;14) [1], der(10)del(10q) [3], -11 [8], 2x -11 [3], +11 [6], 2x +11 [2], 4x +11 [1], der(11)t(11;18) [1], der(11)del(11) [3], -12 [21], 2x -12 [1], 3x -12 [2], -13 [18], 2x -13 [6], +13 [4], der(13)t(13;13) [1], -14 [4], 2x -14 [2], +14 [9], 2x +14 [3], der(14)del(14) [1], -15 [22], 2x -15 [3], +15 [1], -16 [9], 2x -16 [2], +16 [3], -17 [10], +17 [5], 2x +17 [1], 3x +17 [1], der(17)tas(17;19) [1], -18 [9], 2x -18 [4], +18 [6], der(18)dup(18) [1], -19 [6], 2x -19 [1], 3x -19 [1], +19 [7], -20 [4], 2x -20 [1], +20 [14], 2x +20 [5], 3x +20 [1], -21 [10], +21 [4], 2x +21 [1], 3x +21 [1], der(21)t(15;21) [1], -22 [11], 2x -22 [1], +22 [3], 2x +22 [1], der(22)t(16;22) [1], -X [2], +X [1], der(X)t(X;22;9) [1], -Y [1], +Y [8]

Die Tabelle 3-10 zeigt die Zusammenfassung aller gefundenen Aberrationen der Linie HPKV-2.



Tabelle 3-11 HPKV-2 prozentuale Verteilung der häufigsten Aberrationen

Chromosomen-aberration	p25	p32	p47
<b>-4</b>	11,5%	26,7%	71,4%
<b>-11</b>	84,6%	20%	31,4%
<b>-12</b>	3,8%	60%	68,6%
<b>-15</b>	7,6%	53,3%	71,4%
<b>-22</b>	23,1%	40%	34,3%
<b>+5</b>	0%	66,6%	68,6%
<b>+8</b>	0%	93,3%	85,7%
<b>+9</b>	0%	66,6%	77,1%
<b>+20</b>	0%	60%	57,1%
<b>del(10)(p?)</b>	19,2%	0%	8,6%
<b>der(1)t(1;3)</b>	0%	80%	68,6%
<b>der(10)t(5;10)</b>	0%	0%	54,3%
<b>der(3)t(3;11)(q10;q10)</b>	84,6%	0%	0%
<b>der(5)t(1;5)(?:p11)</b>	76,9%	0%	0%
<b>der(7)t(7;18)</b>	0%	0%	60%
<b>i(10q)</b>	92,3%	0%	0%

Tabelle 3-11 zeigt, dass mit steigender Passagierung die Heterogenität der Karyotypen zunimmt. Spezielle Veränderungen finden sich in allen Zellen wieder, andere Veränderungen gehen mit der Passagierung verloren.

Der Verlust des Chromosoms 11 scheint durch eine Duplikation des nicht deletierten Chromosoms im Laufe der Passagierung ausgeglichen zu werden. Aufschluß über diese Vermutung können lediglich LOH-Analysen geben.

In den frühen Passagen tritt ein Isochromosom 10q auf, das in späteren Passagen nicht wiedergefunden wird. Anstelle dieser Aberration des Chromosoms 10 wird eine Translokation 5;10 gefunden, wobei der lange Arm von Chromosom 10 transloziert vorliegt.

In einigen Metaphasen kann man erkennen, dass Chromosomen nicht vollständig voneinander getrennt wurden. Zum Teil sind sogar unterschiedliche Chromosomen von diesem Phänomen betroffen (Abb. 3-9). Möglicherweise handelt es sich dabei um multiradiaale Chromosomen, die auch in Zellen der Hämoipoese von Patienten mit einem Fehler im DNA-Methylierungssystem auftreten (Tsien et al., 2002). Hier handelt es sich um einen in Kultur entstandenen Defekt. Im Zusammenhang mit der Infektion durch HPV wurde dieses Phänomen nicht beschrieben.



**Abbildung 3-9 Beispiel für triradiale Chromosomen**

#### 3.4.3.5 Zusammenfassung: Ergebnisse aller HPK-Zelllinien

Die Linien HPKIA, HPKII, HPKIII und HPKV wurden im Rahmen einer vorhergehenden Studie mittels CGH (comparative genomic hybridisation) auf chromosomale Aberrationen untersucht. Hierbei lassen sich nur Verluste und Zugewinne feststellen. Ploidien und Translokationen bleiben unerkannt. Eine der in der Studie von Solinas-Toldo et al. (1997) erkannten Aberrationen ist der Verlust des kurzen Armes von Chromosom 10. Dieser Verlust konnte auch in dieser Studie in allen Zelllinien bestätigt werden. Chromosom 10 ist in unterschiedliche strukturelle Veränderungen involviert. In HPKII-2 sind sowohl ein deletiertes Chromosom 10 wie auch eine Translokation mit Chromosom 14 vorhanden. Auch in HPKV-2 ist das Chromosom 10 deletiert und zusätzlich wird eine t(5;10) gefunden.

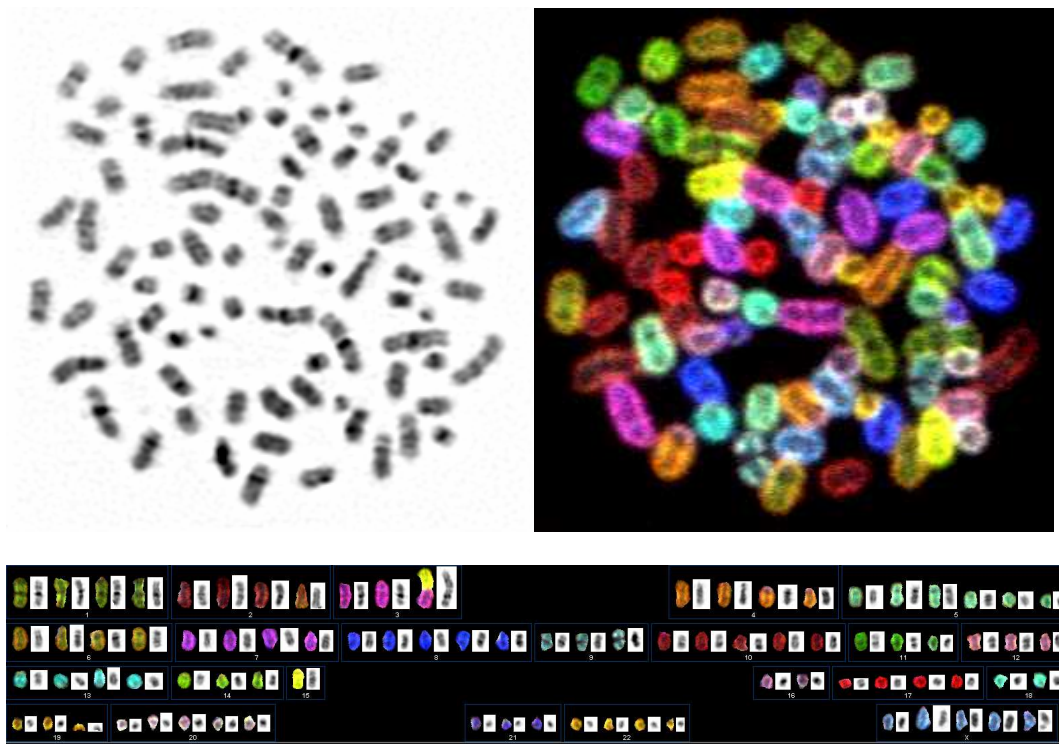
Weiterhin treten in allen Zelllinien eine Überrepräsentation des Chromosoms 5, sowie die Deletion des Chromosom 18 auf, mit Ausnahme der Passage 32 von HPKV-2. In diesen Fällen handelt es sich ausschließlich um numerische Aberrationen.

Weitere in allen Zelllinien auftretende Aberrationen sind die Deletion des Chromosoms 4 und die Duplikation der Chromosomen 8, 11 und 20. In drei von vier Zelllinien (nicht in HPK V-2) liegt das Chromosom 7 in unterschiedlichen Aberrationen vor. In HPKIa-2 gibt es eine t(7;12) zusätzlich zu den normal vorhandenen Chromosom 7 Kopien, in HPKII-2 und HPKIII-2 ist es jeweils deletiert.

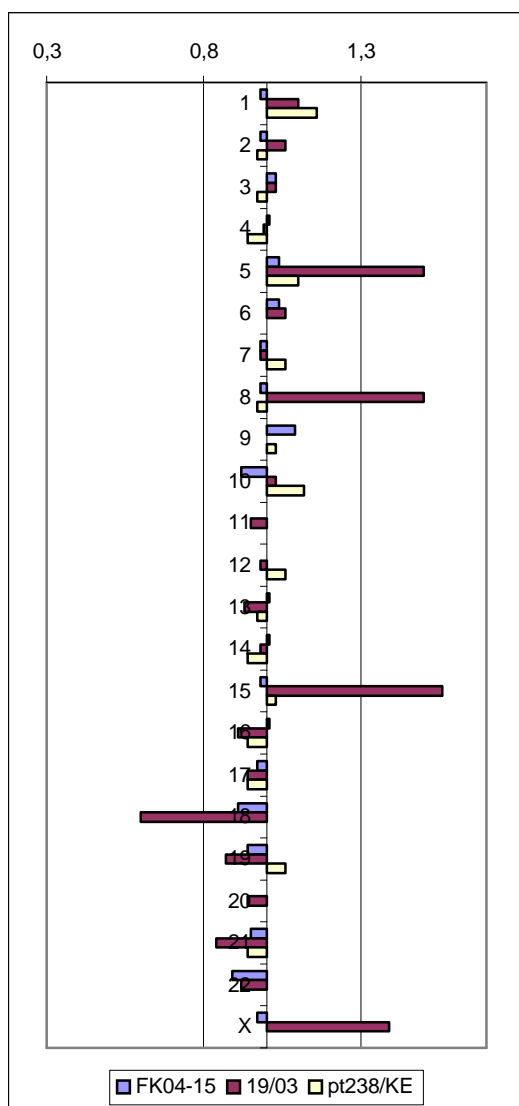
#### 3.4.4 Ergebnisse primärer Kulturen

Von den vielen in Kultur gebrachten Geweben (etwa 200 Proben) konnten nur 2 mittels SKY-FISH untersucht werden. Als Hindernis sind in allen Fällen die unter 3.1. erwähnten Schwierigkeiten zu sehen.

In beiden Fällen handelt es sich um Gewebe aus Tumoren aus der Zervix. Die Menge des zur Verfügung gestellten Gewebes war ausreichend groß, um vier Petrischalen mit Explants zu bestücken. In beiden Fällen wurde nach einigen Tagen mit bestrahlten 3T3 Feeder-Zellen supplementiert. Nach etwa einer Woche waren große Kolonien mit Keratinozyten ausgewachsen. Der Fall 19/03 wies nach drei Passagen ein starkes Wachstum an Fibroblasten auf, die erst nach mehrmaligen differentiellem Splitting komplett entfernt waren.



**Abbildung 3-10 Metaphase aus dem Tumor 19/03: links oben: DAPI-Aufnahme, rechts oben: SKY-Bild, unten: Karyogramm**



**Abbildung 3-11 Numerische Aberrationen in einer primären Zellkultur aus Zervix-karzinomen**

#### 3.4.4.1 Zellkultur 1 (19/03)

Bei diesem Tumor handelt es sich laut Histologie um ein sarkomatoides Karzinom mit Lokalisation in der Zervix. Da weder in der GP5+/6+ PCR-EIA noch in der HPV-Typenspezifischen E6-PCR HPV nachgewiesen werden konnte, ist ungewiß, ob es sich tatsächlich um ein Zervixkarzinom des Epithels handelt, oder ob es seinen Ursprung in einem anderen Gewebe eines anderen Organs hat.

Die Kultur konnte weit über 50 Passagen geführt werden und lieferte ab Passage 10 ausreichend Metaphasen, die für die SKY-FISH verwendbar waren.

38 Metaphasen waren auswertbar. 14 Metaphasen sind diploid, 9 triploid, 14 tetraploid und eine pentaploid.

In dieser Kultur fanden sich viele, häufig auftretende Aberrationen, darunter viele Translokationen. Ein Beispiel für diese Kultur ist die Abbildung 3-10. In ihr erkennt man auch die t(3;15). Die numerischen Aberrationen sind im Verhältnis zur Ploidie in der Abbildung 3-11 dargestellt, die häufigsten Aberrationen finden sich in Tabelle 3-12. Eine Zusammenfassung aller Aberrationen zeigt die Tabelle 3-13.

Sehr häufig findet sich die Kombination aus dem Verlust des Chromosoms 15 und eines Isochromosoms 15, beide Aberrationen finden sich jeweils in 34 der 38 untersuchten Metaphasen. Nur in zwei Metaphasen sind beide Aberrationen nicht zu sehen. Somit gibt es bei beiden Aberrationen keinen Zugewinn oder Verlust von Chromosom 15-Regionen.

In 31 von 38 Metaphasen findet sich eine Translokation t(4;16). Die 7 Metaphasen ohne diese Translokation werden einem Subklon zugeordnet, der alle sonstigen häufigen Veränderungen grundsätzlich aufweist.

**Tabelle 3-12 Häufige Veränderungen in den primären Zelllinien**

<b>Chromosomenaberration</b>	<b>19/03</b>	<b>pt238KE</b>
<b>+1</b>	31,6%	31,25%
<b>-4</b>	15,8%	18,8%
<b>+5</b>	65,8%	86,8%
<b>der(5)del(5p)</b>	92,1%	25%
<b>der(5)del(5q)</b>	81,6%	
<b>-15</b>	92,1%	6,3%
<b>der(15)i(15q)</b>	92,1%	18,8%
<b>+8</b>	92,1%	6,3%
<b>der(4)t(4;16)</b>	84,4%	0%
<b>+X</b>	81,5%	6,3%
<b>der(11)t(5;11)</b>	73,7%	0%
<b>der(X)t(X;13)</b>	0%	81,3%
<b>der(13)del(13)</b>	2,6%	75%
<b>+10</b>	31,3%	18,4%
<b>der(14)i(14q)</b>	6%	25%
<b>der(18)del(18)</b>	0%	18,8%
<b>der(7)del(7)</b>	0%	18%
<b>+12</b>	7,9%	18,8%

Das Chromosom 5 ist in dieser Zelllinie sehr häufig fragmentiert, es liegen ein Teil des kurzen Armes (35/38) und das reziproke Derivat (31/38) einzeln vor, meist auch in größerer Kopienzahl. Daher ergibt sich eine numerische Aberration des Chromosoms 5 (34/38). Möglicherweise ist die Fragmentierung des Chromosoms 5 auch eine Ursache für die Translokation mit Chromosom 11 (28/38).

Weitere häufige Aberrationen sind +X (30/38), +8 (35/38) und -18 (29/38).

#### 3.4.4.2 Zellkultur 2 (pt238KE)

Die HPV-typspezifische E6-PCR identifizierte diesen Tumor als HPV18-positiv. Die Kultur wurde bis zur Passage 20 geführt, wonach der Großteil der Zellen seneszent wurde.

**Tabelle 3-13 Karyotypen der primären Kulturen 19/03 und pt238/KE**

Kultur/ Passage	Modalzahl	Aberrationen
19/03	41-107	-1 [5], +1 [8], 2x +1 [3], 3x +1 [1], der1t(1;8) [1], der(1)t(1;5) [4], der(1)del(1)a [3], der(1)del(1)b [1], -2 [3], 2x -2 [1], +2 [8], 2x +2 [2], der(2)del(2?) [1], -3 [8], +3 [8], 3x +3 [1], der(3)t(3;15) [2], der(3)del(3?) [1], der(8)del(8) [1], der(17)del(17) [2], der(9)del(9) [1], -4 [4], 2x -4 [2], +4 [7], der(4)t(4;16) [24], 2x der(4)t(4;16) [8], der(4)t(4;12) [1], +5 [15], 2x +5 [12], 3x +5 [2], 4x +5 [4], der(5)del(5q) [19], 2x der(5)del(5q) [12], del(5)der(5p?) [21], 2x del(5)der(5p?) [13] 3x del(5)der(5p?) [1], 4x del(5)der(5p?) [1], -6 [3], +6 [6], 2x +6 [2], -7 [9], +7 [3], 2x +7 [2], +8 [16], 2x +8 [16], 3x +8 [3], -9 [7], +9 [5], 2x +9 [2], der(9)t(5;9) [1], -10 [2], 2x -10 [2], +10 [6], 4x +10 [1], der(10)del(10) [3], -11 [6], 2x -11 [3], der (11)t(5;11) [20], 2x der (11)t(5;11) [7], 3x der (11)t(5;11) [1], der(11)del(11) [3], -12 [7], +12 [2], 3x +12 [1], -13 [7], 2x -13 [1], 3x -13 [1], +13 [4], der(13)del(13?) [1], -14 [6], 2x -14 [3], +14 [5], 2x +14 [1], der(14)t(14;15) [2], der(14)i(14) [1], -15 [19], 2x -15 [12], 3x -15 [2], 4x -15 [1], der(15)i(15q) [28], 2x der(15)i(15q) [5], 3x der(15)i(15q) [1], 2x der(15)del(15?) [1], -16 [9], 2x -16 [3], +16 [4], 2x +16 [1], der(16)del(16q) [2], der(16)del(16p) [1], -17 [8], 2x -17 [1], +17 [3], der(17)t(17;20) [1], -18 [14], 2x -18 [12], 3x -18 [3], +18 [1], -19 [9], 2x -19 [4], +19 [2], -20 [10], 2x -20 [1], +20 [5], -21 [9], 2x -21 [3], 3x -21 [2], +21 [3], der(21)t(5;21) [1], -22 [8], 2x -22 [2], +22 [3], +X [18], 2x +X [9], 3x +X [3], der(X)t(1;X) [1], der(X)del(X) [2], 2x der(X)del(X) [1]
Pt 238/KE	30-91	+1 [4], 2x +1 [1], der (1)del(1?) [1], -2 [1], +2 [1], -3 [2], +3 [1], -4 [3], +4 [2], der(4)del(4) [1], -5 [1], +5 [3], 2x +5 [1], der(5)del(5) [4], -6 [2], +6 [2], der(6)del(6q) [1], der(6)del(6?) [1], +7 [2], der(7)del(7) [3], -8 [2], +8 [1], der(8)del(8) [1], -9 [1], +9 [2], der(9)del(9) [1], -10 [1], +10 [5], der(10)del(10?) [3], der(11)del(11) [1], der(11)t(1;11) [1], -12 [1], +12 [3], der(12)del(12) [1], -13 [3], +13 [2], der (13)del(13) [12], 2x -14 [1], der(14) [1], der(14)i(14) [4], der(14)dup(14p) [1], -15 [1], 2x +15 [1], der(15)i(15) [3], -16 [2], -17 [2], -18 [1], +18 [1], der(18)del(18) [3], +19 [2], der(19)i(19) [1], -20 [1], +20 [1], -21 [2], +22 [1], -X [1], der(X)t(X;13) [13], +X [1]

In der 8. Passage konnten Metaphasen gewonnen werden, wovon sich 16 Metaphasen als auswertbar erwiesen. In der Hauptsache sind die ausgewerteten Metaphasen diploid

(13/16), zwei sind haploid und eine ist tetraploid. 15/16 Metaphasen scheinen einen Klon zu repräsentieren, der 2 charakteristische Aberrationen aufweist. Es handelt sich dabei um eine Translokation  $t(X;13)$ , sowie ein Derivatchromosom 13. In 1/16 Metaphasen findet sich keines dieser Markerchromosomen und wird daher einem weiteren Klon zugeordnet. Alle weiteren Aberrationen sind seltener und werden wahrscheinlich erst in weiterführender Kultur oder vielleicht auch in Metastasen eine Rolle spielen.

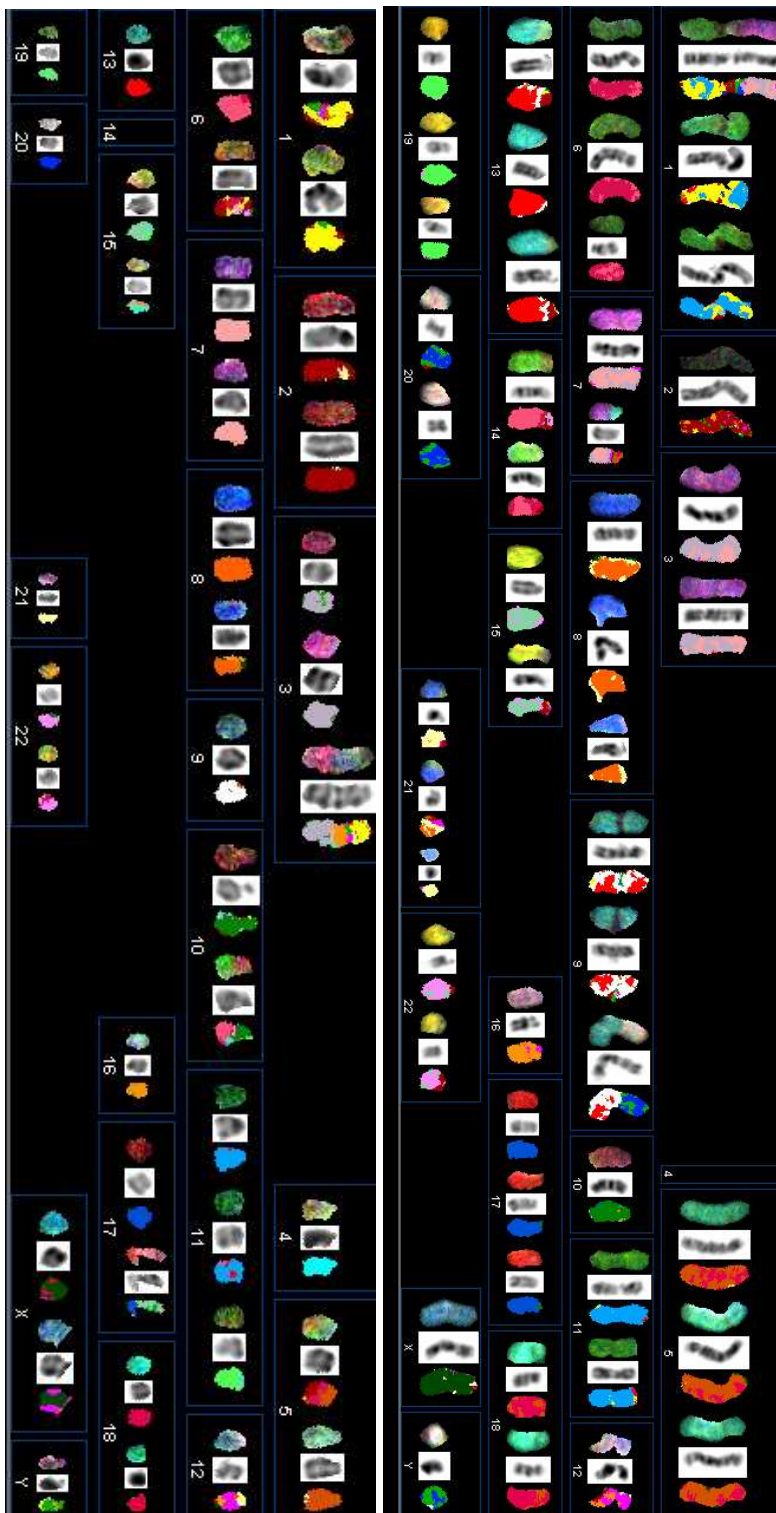


Abbildung 3-12 Karyogramme aus den Zelllinien HPKII-2 (links) und HPKV-2 (rechts)

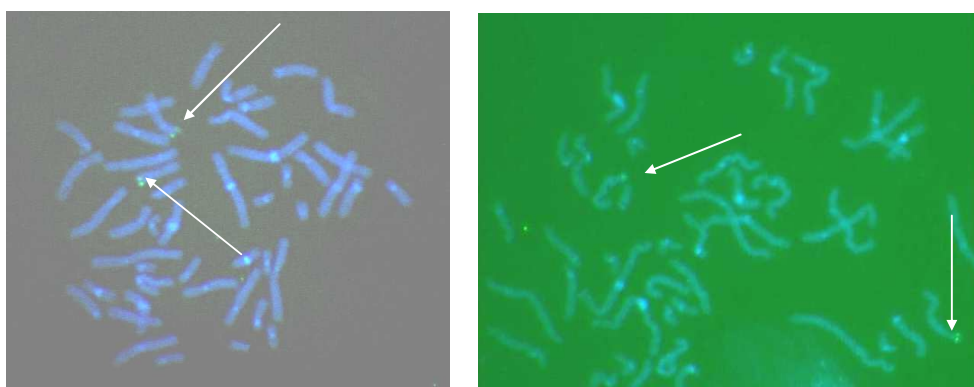
### 3.5 Interphasen-FISH

Die Interphasen-FISH mit Sonden aus künstlichen Hefechromosomen wurde optimiert. Kritisch sind neben der Herstellung der Sonden auch die Vorbehandlung der Schnitte sowie die optimale Hybridisierungsdauer. Es sollte an klinischen Geweben, also CIN



und Tumoren überprüft werden, ob der Verlust des kurzen Armes von Chromosom 10 auftritt und in der frühen Karzinogenese eine Rolle spielt. Auch kann durch eine Verwendung einer großen Zahl an Geweben und vieler dicht nebeneinanderliegender Sonden eine Region ermittelt werden, die in vielen Tumoren deletiert ist. Diese Region ist dann als putative Tumorsuppressorregion eingegrenzt.

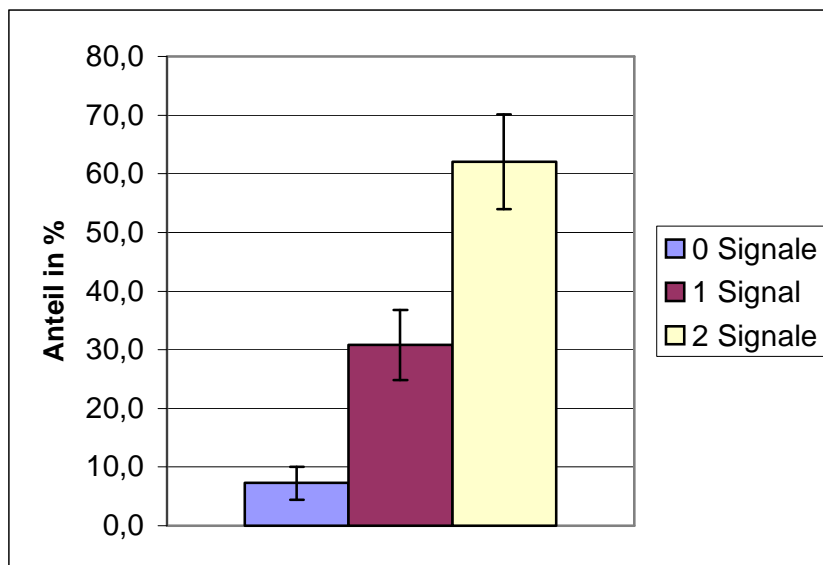
Jede Sonde mußte vor der Verwendung an den Schnitten an Blutpräparaten getestet werden (Beispiele siehe Abb. 3-13). Damit ließ sich im Vorfeld abklären, ob sie ausschließlich in der richtigen Region bindet und ein ausreichend starkes Signal liefert. Nicht alle Sonden aus Hefechromosomen waren tatsächlich geeignet.



**Abbildung 3-13 Sonden 751d05 und 927g05- Test an Blutpräparaten**

Für jede Sonde wurden auch die Fluoreszenzsignale in normalem, den Tumor umgebenden Plattenepithel ausgezählt, um die erhaltenen Werte als normale Verteilung zu verwenden.

Die Signalverteilungen wurden als Standardwert herangezogen. Aus allen erhaltenen Signalverteilungen im Normalgewebe der unterschiedlichen Fälle wurden die arithmetischen Mittel und die Standardabweichungen ermittelt.



**Abbildung 3-14 Durchschnittliche Verteilung der Signale in Normalgewebe unter Verwendung aller Sonden.**

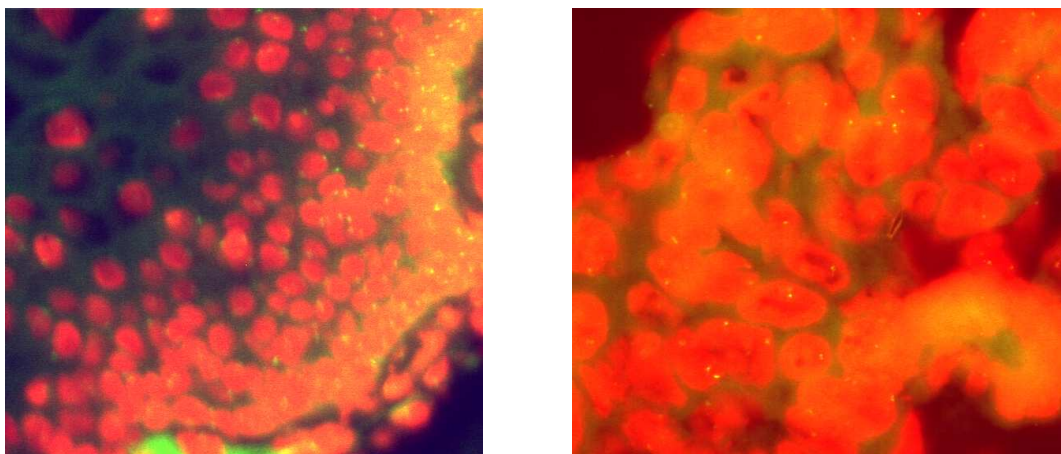
In Hybridisierungen mit allen Sonden ergab sich im Mittel, daß weniger als 10% der Kerne 0 Signale, mehr als 30% 1 Signal und mehr als 60% 2 Signale aufwiesen (siehe auch Abbildung 3-14). Als Schwellenwert für den Verlust wird der prozentuale Anteil von einem Signal mit der zweifachen Standardabweichung addiert. Im Falle dieser Sonden wird ein Anteil von 43,8% oder mehr als Zeichen für einen Verlust angesehen.

Für die vorliegende Studie wurden bis zu 17 Fälle von Tumoren pro Sonde untersucht (siehe Abb. 3-17). Die Zahl der untersuchten Tumore richtete sich nach der Verfügbarkeit von Schnitten dieses Tumors und nach der Funktionsfähigkeit der Sonde.

Die Unterschiede zwischen den Signalverteilungen in Normalgeweben und den pathologischen Geweben wurden zusätzlich mittels Chi-Quadrat-Test auf Signifikanz überprüft. Dies ist in der Literatur der am häufigsten angewandte statistische Test (z. B. Bulten et al., 1998). Die Signifikanzschranke  $p$  lag bei 0,05.

Tumore, die für alle Sonden eine große Zahl von Signalen pro Zellkern aufwiesen, wurden auch mit einer Zentromersonde für das Chromosom 4 hybridisiert. War die Signalzahl pro Kern auch hier durchgehend größer als drei, wurde der Tumor als polyploid eingestuft.

Für Fälle mit einer Signalverteilung, die auf eine Amplifikation der Signalsequenzen hinweist, wurde der Chi-Quadrat-Test nicht durchgeführt, da in diesen keine relativen Verluste nachgewiesen werden können.



**Abbildung 3-15 Beispiel für eine Interphasen-FISH mit der Zentromersonde an einem Schnitt: normales Gewebe und CIN**

Die meisten Tumore konnten mit der Zentromersonde untersucht werden. Dies war auch in den meisten Fällen der erste Ansatz, in dem sichtbar wurde, ob sich der Fall für die Untersuchung eignet. Ist ein Gewebe stark nekrotisch oder enthält viele Blutzellen, so kann sich dies störend auswirken. Durch das Ablösen des Gewebes vom Objektträger oder der starken Fluoreszenz der Erythrozyten sind derartige Fälle nicht verwendbar.

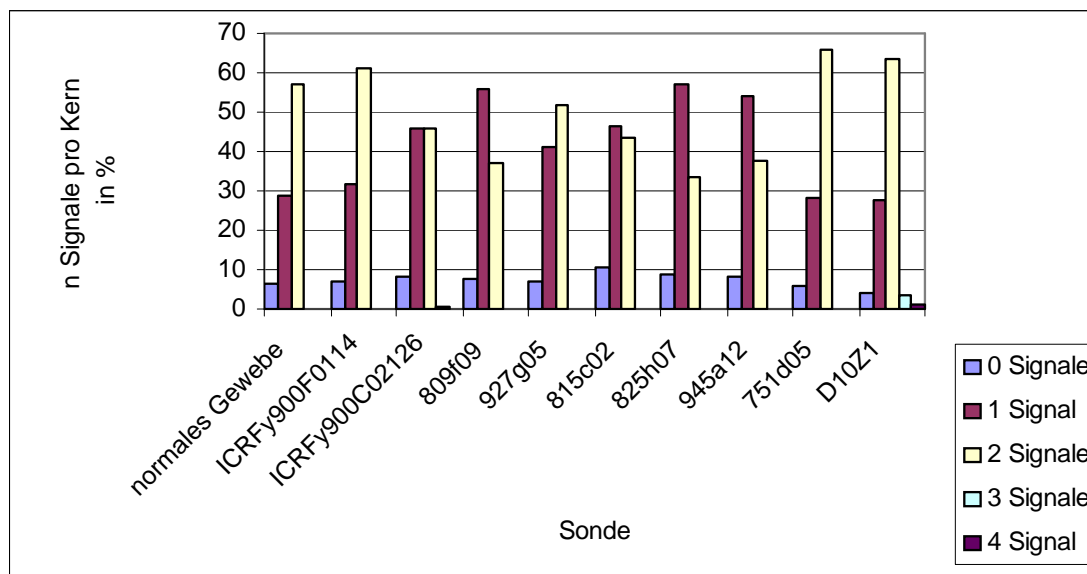
Zudem ist diese eine verlässliche Sonde mit ausreichend starken Signalen (ein Beispiel zeigt die Abb. 3-15), was das Auszählen vereinfacht oder ermöglicht.

Die Abbildung 3-16 zeigt die Signalverteilungen, die nach Hybridisierung mit mehreren Sonden erhalten wurden: Die drei Säulen links zeigen die prozentualen Anteile der Kerne mit 0, 1 und 2 Signalen in normalem Gewebe. Rechts davon werden die Signalverteilungen der Hybridisierungen des Tumors Nummer 8 (siehe Tabelle 3-8) mit Sonden, die auf 10p binden, gezeigt.

Die CIN-Läsionen konnten nur mit der Zentromersonde untersucht werden. Dies lag an der geringen Größe der Läsion. Versuche, eine Dicolour-FISH zu etablieren, scheiterten.

Wie die Tabelle 3-8 zeigt, ist die Zentromer-Region des Chromosom 10 in einer von vier CIN-Läsionen deletiert. Dieser Verlust war auch in einer der CIN benachbarten Metaplasie zu finden.

In einer weiteren CIN-Läsion ist der Anteil von drei Signalen pro Kern erhöht. Das bedeutet eher die Tendenz zur Triploidie.



**Abbildung 3-16** Ergebnisse der Interphasen-FISH für den Tumor Nr. 8 (wie Tabelle 3-8) , links ist die Verteilung für normales Gewebe, die hohe Zahl von Kernen mit nur einem oder keinem Signal ergeben sich aus dem Anschneiden der Kerne des Gewebes

Die Zentromersonde war die einzige Sonde, die für die CIN-Läsionen verwendet wurde.

**Tabelle 3-14** Hybridisierungsergebnisse: -= kein Verlust, += Verlust

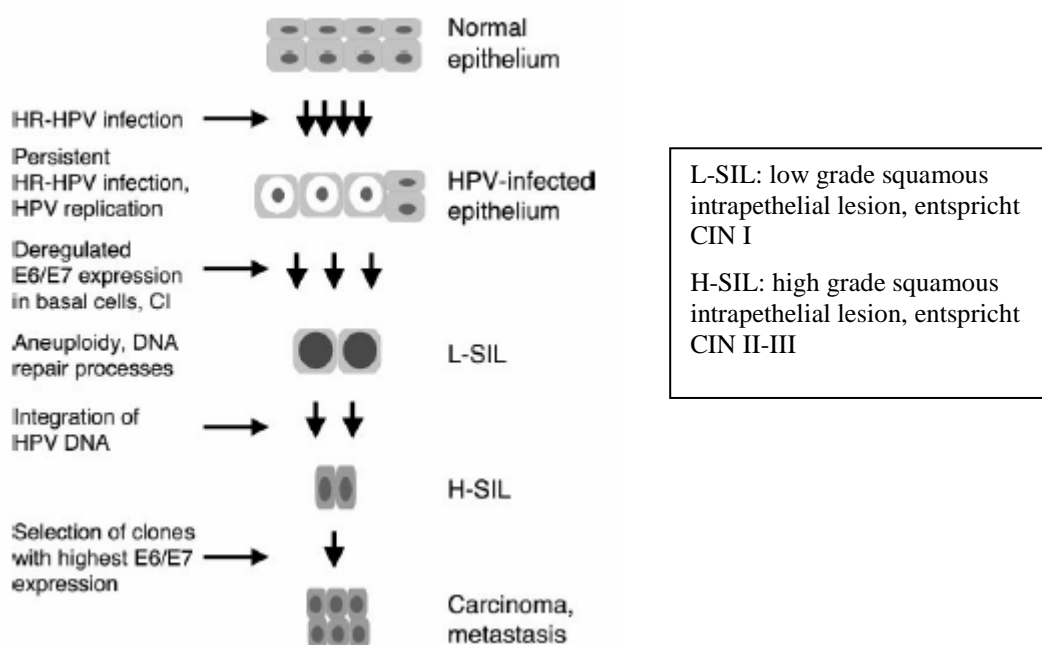
Tumor	751 d05	809 f09	815 c02	927 g05	825 h07	952 c01	945 a12	D10Z1
1	-	+						-
2	+	-				-		+
3	+	+		+				+
4	+							+, teilweise -
5	-		-				+	
6		+	-					-
7	+		+					
8	-	+	+	+	+		+	-
9		-						-
10	+	+						+
11	+							
12	-	+						-
13		+						-
14	+	-						-
15								+

Die Abbildung 2-1 (Material und Methoden) zeigt ein Schema der verwendeten Sonden und ihre annähernde Lokalisation. Die Tabelle 3-8 zeigt die Ergebnisse, die mittels Interphasen-FISH ermittelt werden konnten.

Es ist zu erkennen, dass mit Ausnahme der Sonde 952c01, die auf dem q-Arm liegt, alle untersuchten Sonden in den untersuchten Tumoren mindestens einmal eine Deletion nachwiesen (Tabelle 3-8). Eine Deletion wurde definiert als eine von der Signalverteilung im Normalgewebe signifikant unterschiedliche Signalverteilung.

## 4 Diskussion

Das initiale, notwendige aber nicht ausreichende Ereignis der Tumorgenese in der Zervix ist die Infektion mit high-risk-Typen der humanen Papillomaviren (Canavan, 2000). Sie erfordert weitere genetische Veränderungen. Insbesondere durch die Bindung der viralen Gene E6 und E7 an die Zellzyklusproteine p53 und pRB kommt es zu einer Deregulation des Zellzyklus und zu einer Anhäufung chromosomaler Veränderungen (Huibregtse und Scheffner, 1994, zur Hausen 2003). Durch die Integration des Virusgenoms in das Wirtsgenom kann es ebenfalls zu Veränderungen in der Expression weiterer Gene kommen (Ferber et al. 2004). Eine schematische Darstellung des Verlaufs zum Karzinom zeigt die Abbildung 4-1.



**Abbildung 4-1 Modell der Progression des Epithels zum Tumor (aus Wentzensen et al., 2004)**

Nicht jede prämaligne Läsion progrediert zum Tumor. Daher sind Merkmale zur Unterscheidung der potentiell progredierenden von persistierenden oder regredierenden Läsionen wichtig, um unnötige Konisationen zu vermeiden.

Die vorliegende Studie hatte zum Ziel, chromosomale Aberrationen zu finden, die in der HPV-vermittelten Karzinogenese in der Zervix häufig sind. Durch die Untersuchung der Zellen von prämaligen Läsionen und malignen Tumoren auf der Basis des gesamten Genoms und des Abgleiches sollten gemeinsame, und damit für die Progression zum Tumor essentielle Veränderungen gefunden werden.

Hierzu ist es notwendig, Biopsien aus CIN und Tumorgewebe in Kultur zu nehmen und die Zellen zu einer für die Chromosomenpräparation ausreichenden mitotischen Aktivität zu bringen.

Als Kontrolle dienten Metaphasen aus Vorhaut-Keratinozyten eines gesunden Probanden. Hierbei sollte überprüft werden, ob Aberrationen in der Kultur entstehen. Es sollte abgeschätzt werden, welche Veränderungen tatsächlich Ergebnis der Infektion mit HPV sind. Da auch die Gewinnung von Metaphasen aus Keratinozyten ohne Kultur nicht möglich war, ist hier die Zahl der schon vor der Kultur veränderten Zellen nicht kalkulierbar.

Die normalen Keratinozyten ließen sich in vier Klone aufteilen. Nicht einmal 50% der Metaphasen aus untransformierten Keratinozyten wiesen keine Veränderungen auf. Dies bedeutet, dass es nicht ausgeschlossen werden kann, dass in Kultur Aberrationen auftreten, oder dass auch vermeintlich normale Epithelzellen kleinere Veränderungen besitzen.

Jedoch stellen Zellen ohne Aberrationen den größten Klon. Die übrigen vier Klone sind ihm zahlenmäßig unterlegen.

Möglich ist, dass die Aberrationen indirekt durch den Epidermalen Wachstumsfaktor (EGF= epidermal growth factor) im Medium verursacht sind. Dieser Wachstumsfaktor kann die Phosphoinositol-3-Kinasen (PI3-K) sowie MAPK (mitogen activated protein kinase) Pathways aktivieren. In-vivo kann diese Veränderung auch unkontrolliertes Wachstum in Gang setzen (Pasonen-Seppanen et al., 2003). Die hierfür erforderliche Menge entspricht jedoch nicht der Konzentration im verwendeten Medium. Eine tumorigen wirkende Konzentration entspräche einer Überexpression. Diese Vermutung wird auch durch die Tatsache bestätigt, dass die Keratinozyten in den Kulturen nicht immortal wurden. Jedoch kann sie in einigen Zellen das Überwinden eines sogenannten Zellzyklus-Kontrollpunktes ausgelöst haben, da der EGF auch autokrin wirkt. Was dann zu den beobachteten strukturellen chromosomalen Veränderungen geführt hat, ist das Resultat zellulärer DNA-Reparaturmechanismen. Die numerischen Veränderungen können durch eine nicht stattgefunden Trennung der Schwesterchromatiden herbeigeführt worden sein. Dies passiert durch Ignorieren der Kontrollpunkte in der frühen Anaphase (Hennig, S. 73, Abb., Ausgabe 1995).

Ein weiterer Faktor für das Auslösen von Aberrationen kann die Verwendung von Calyculin A sein, das diese Kontrollpunkte des Zellzyklus ebenfalls ignorieren läßt. Als

Folge kann man in allen untersuchten Zellen Aberrationen sehen, die bei Gebrauch von Colcemid auch bei einer guten Teilungsrate nicht sichtbar geworden wären. Die Zellen werden durch das Calyculin A an einem Punkt der Mitose festgehalten oder befinden sich in der Interphase oder G<sub>0</sub>-Phase. Auch in vivo wäre in diesen Zellen möglicherweise eher die Apoptose eingeleitet, als dass sie die Metaphase durchschritten hätten.

Es ist jedoch eindeutig, dass diese wenigen Veränderungen für die Wachstumsfähigkeit der Zellen keine Bedeutung haben können, da sie nicht-klonal auftreten und auch nicht zu immortalem Wachstum führten.

4/29 Karyotypen (13,8%) der nicht-transfizierten Vorhautkeratinozyten weisen Ploidie-Veränderungen auf. Dies ist im Vergleich zum Zustand der HPK-Zellen auffällig wenig. Die beiden primären Zellkulturen aus Zervixkarzinomen sind ebenfalls nicht hochpolyploid, sondern in der Hauptsache diploid und maximal tetraploid. Da in fast allen HPK-Zelllinien Polyploidien auftraten ist schwer abzuschätzen, ob Zellkultur-artefakte oder die Transfektion selbst ursächlich sind. Auch hier sind Artefakte durch das Calyculin A häufig.

HPKV-2, die einzige mit HPV 18 transfizierte Zelllinie ist in Passage 25 noch diploid.

Probleme in der Etablierung von primären Zelllinien

Die primäre Kultivierung von Tumorzellen ist ein schwieriges Unterfangen. Einige wenige Publikationen weisen bereits auf das Problem hin, eine reine Kultur von Keratinozyten zu erhalten. Koopman et al. (1999) zeigen dabei sämtliche Schwierigkeiten auf:

- Kontamination durch Fibroblasten (trotz der Verwendung von Hydrocortisol, das deren Wachstum unterdrücken sollte),
- durch Bakterien und Pilze (trotz Antibiotika/Antimycotica-Zugabe) oder
- dem Phänomen, dass Zellen höhergradiger Tumore besser adherieren und anwachsen, eine Vielzahl von Zellen jedoch auch schnell seneszent wird.

Ein zusätzliches Problem der vorliegenden Arbeit war, dass es sich in vielen Fällen nicht um Tumore, sondern um zervikale intraepitheliale Neoplasien handelte. Laut Koopman ist ihre Kultur auf Grund des niedrigen Grades fast unmöglich. Die Läsionen sind von sich aus klein, mußten jedoch für die nähere Untersuchung in der Pathologie halbiert werden. Die geringe Menge an Zellen war nicht ausreichend, um eine



erfolgreiche Kultur zu etablieren. Es waren Vorversuche mit den Feeder-Zellen (bestrahlte 3T3-Zellen, fetale Fibroblasten aus der Maus) und länger kultivierten HPKIA-Zellen durchgeführt worden. Diese zeigten, dass eine Mindestanzahl an wachsenden Keratinozyten erforderlich ist, um mit dieser Art der Kokultur erfolgreich zu sein. Diese Mindestzahl liegt bei etwa 100 Zellen.

Auch Versuche mit verschiedenen Medien und Beschichtungen der Kulturschalen konnten keine Abhilfe schaffen.

Selbst in den Fällen, in denen Zellen adherierten und die gewünschte Morphologie zeigten, war eine Präparation aufgrund der immer noch geringen Zahl nicht möglich. Die Kultur auf so genannten Chamber Slides (erhältlich mit unterschiedlichen Beschichtungen), konnte zwar in erfolgreichen Kulturen Chromosomenpräparate auch in der erforderlichen Dichte hervor bringen, führte jedoch nicht zu einer ausreichenden Ausbreitung der Chromosomen.

Bhatia et al. fassen 1999 verschiedene Möglichkeiten der Kokultur für Hepatozyten zusammen: Neben den artfremden Zellen und organfremden Zellen können auch Zellen aus demselben Organ als Feeder verwendet werden. Hierbei spielen Zell-Zell-Interaktionen eine wichtige Rolle. Für die bloße Vermehrung der Zellen über einige Tage reichen zum Beispiel 3T3 Zellen, bei ausreichender Zahl primärer Zellen kann sogar einfach durch Feeder-Zellen konditioniertes Medium ausreichen. Bei geringen Zahlen der primären Zellen erleichtert die Zelldichte der Feederlayer ein Anwachsen. Diese Maßnahmen erfordern einen hohen zeitlichen und materiellen Aufwand, und lassen sich nicht immer ohne weiteres durchführen.

Auch die Kultur von Kopf- und Nacken-Plattenepithelkarzinomen für die Durchführung von SKY-Analysen erwies sich in den Händen von Squire et al (2002) als wenig erfolgreich. Von 5 primären Tumoren konnte lediglich einer mittels dieser Methode analysiert werden, dies jedoch auch nicht in ausreichender Qualität um die Möglichkeiten der SKY-FISH ausnutzen zu können. Dies lag ebenfalls an der mäßigen Qualität und Quantität der Metaphasen. Die Analyse der gut wachsenden Zelllinie HeLa war in der Studie von Macville und Mitarbeitern (Macville et al., 1999) mit Schwierigkeiten behaftet, da die Auflösung der Chromosomen zu gering war.

Aufgrund der Schwierigkeit dieser Studie, Zellen aus Biopsie- oder Tumorgewebe auswachsen zu lassen, mußte zum Modell der Karzinogenese zurückgekehrt werden. Hierfür wurden die 1996 etablierten HPK-Zelllinien in frühen Passagen verwendet. Die

zwei Kulturen aus Zervixkarzinomen fanden als Beispiel in der SKY-FISH Verwendung.

#### *Das Modell HPK-Zelllinien*

Als Modell der zervikalen Karzinogenese waren Keratinozyten aus Vorhaut-Epithel mit HPV transfiziert worden und sowohl auf die HPV-Integration, die Zugehörigkeit zu einer Komplementationsgruppe nach Pereira-Smith (Seagon et al., 1994) und auf die genetischen Veränderungen (Solinas-Toldo et al., 1997) untersucht worden. In der vorliegenden Studie sollten diese vier Zelllinien auf strukturelle Aberrationen (insbesondere balancierte Translokationen) hin untersucht werden. Dazu wurden die gleichen Ausgangszelllinien, wie für die Untersuchungen von Solinas-Toldo et al., (1997) verwendet. Hierdurch war ein direkter Vergleich möglich, der die Konstanz der damals festgestellten Aberrationen überprüfen konnte, wodurch auch ein Blick auf die Wahrscheinlichkeit einer Aberration möglich wird.

Auch in anderen SKY-Studien werden Ergebnisse aus der CGH derselben Tumorzellen herangezogen, um die Ergebnisse zu ergänzen (Macville et al, 1999). In der CGH gehen auf jeden Fall alle Zellen in die Untersuchung ein, so dass die im untersuchten Gewebe häufigsten Aberrationen erkannt werden. Der Vergleich mit der CGH ist immer nur bedingt möglich, da diese Methode nur einen Überblick über die Zellen eines Tumors geben kann, die am stärksten vertreten sind. Das bedeutet, dass unberücksichtigt bleibt, wie viele Chromosomen in der einzelnen Zelle amplifiziert oder deletiert sind, auch die Modalzahl ist nicht erkennbar. Auch bleiben Aberrationen unerkannt, die in weniger als 40% der untersuchten Zellen vorhanden sind (Ried et al., 1999). Dahingegen bleiben in der SKY-FISH Aberrationen unerkannt, die nur in Zellen vorhanden sind, die nicht in die Metaphase gebracht werden können (Singh et al., 2001).

Eine große Heterogenität der Klone konnte in dieser Studie jedoch nicht festgestellt werden. Es befand sich selten mehr als ein Klon in der Kultur. Abgesehen davon ist es jedoch möglich, dass andere, kleine Klone auch in der SKY-FISH von dem Hauptklon dominiert werden, weil sie sich langsamer oder nicht teilen und daher seltener in die Metaphase zu bringen sind.

Diese Beobachtung steht nicht im Einklang mit den publizierten Ergebnissen der Literatur, in denen Polyploidie ein Phänomen einzelner Zellen war.

HPKII-2 konnte nicht über die Passage 20 hinaus geführt werden. Interessant ist hierbei, dass aus demselben Transfektionsansatz bereits Zellklone immortal geworden sind.

Dies scheint keine Garantie für eine Immortalisierung aller Klone zu sein. Es deutet auch darauf hin, dass die in dieser Studie erhaltenen Ergebnisse nur bedingt mit denen der CGH-Studie vergleichbar sind, weil die genetischen Veränderungen von einem anderen Klon stammen.

Möglicherweise zeigt es auch, dass chromosomale Aberrationen zu einem späteren Zeitpunkt in der Tumorgenese zufällig auftreten und diese Ereignisse auf vorteilhafte Genotypen selektiert werden. Durch fragile Stellen, die über das gesamte Genom verteilt sind, sind jedoch bestimmte Bruchpunkte wahrscheinlich.

Walter und Mitarbeiter (Walter et al., 2004) wiesen nach, dass die Lage der Chromosomen im Kern während bestimmter Stadien des Zellzyklus ähnlich sind, und vermuteten, dass bestimmte Ereignisse wahrscheinlich sind. Dazu gehören z.B. Translokation unter Beteiligung gleicher Chromosomen.

### *Polyploidie*

Viele der untersuchten Zelllinien sind hochgradig polyploid. Am auffälligsten ist hier die Zelllinie HPKIA-2: Metaphasen haben in der Hauptsache mehr als 10 Chromosomensätze (pentaploid und höher). Es wurden bis zu 291 Chromosomen beobachtet. Da diese hochpolyploiden Karyotypen in der Passage 37 nicht mehr auftreten, ist anzunehmen, dass diese Zellen einen Wachstumsnachteil haben oder ihr Wachstum gar nicht mehr möglich ist. Es werden maximal tetraploide Karyotypen beobachtet. Dies scheint das Maximum an DNA-Menge zu sein, die für Zellen in Kultur keinen Wachstumsnachteil darstellen.

Es ist nicht zu klären, ob die Polyploidie der Zelllinie 19/03 als Folge der Zellkultur entstanden ist. Hierfür müßte eine Interphasen-FISH mit 2-3 Zentromersonden am paraffineingebetteten Gewebe des Tumors durchgeführt werden. Es wurde auch der Zusammenhang zwischen Ploidie-Grad und der Aggressivität des Tumors untersucht (Böcking, 1998). Der Autor schließt, dass diploide und polyploide Zellen im Abstrich der Zervix in den meisten Fällen auf eine Regression, aneuploide Zellen dagegen auf eine Progression hinweisen.

Polyploidie spielt eine nicht zu unterschätzende Rolle in der Generierung chromosomaler numerischer Aberrationen. Durch die hohe Zahl an Chromosomen ist ihre Aufteilung auf die zwei Tochterzellen schwieriger und fehleranfälliger. Olaharski und Mitarbeiter (Olaharski et al., 2003) untersuchten die Ploidie in zervikalen Abstrichen, weil sie davon ausgehen, dass Tetraploidie Aneuploidie vorausgeht.

Kommen dann noch weitere Fehler in der Metaphase hinzu, (z.B. Non-Disjunction der Chromatide) oder nicht-homologe Rekombinationen, sind Veränderungen die direkte Folge.

Die Ploidie von CIN in Patientinnen unter 35 und über 50 Jahre mit ohne benachbartem Tumor wurde von Hanselaar und Mitarbeitern mittels Zytophotometrie untersucht (Hanselaar et al., 1988). Sie konnten feststellen, dass Polyploidie in 55% der CINs der Patientinnen und ohne Karzinom unter 35 Jahren auftrat, in der Gruppe der über 55jährigen jedoch nur zu 13%. In der Gruppe der unter 35jährigen sowie der über 55jährigen mit Karzinom lag der Anteil der polyploiden CIN bei 10%.

Die Tatsache, dass viele Metaphasen aus HPK-Zellen polyploid sind, läßt vermuten, dass der Mechanismus der Mitose in seiner korrekten Durchführung gestört ist. Die Aufteilung der Chromosomen (Metaphase) und die Zellteilung finden nicht statt. Stattdessen erfolgt ein weiterer Durchlauf in der Synthesephase. Die Zellen bleiben letztendlich teilungsfähig, möglicherweise durch einen Dosiseffekt der fehlenden oder nur teilweise inaktivierten Gene der Mitose-Kontrolle (eines der Allele trägt den aktiven Faktor zur Mitose noch, durch seine Amplifikation wird er wieder stärker exprimiert und kann die Mitose wieder in Gang setzen). Eine Konsequenz dieser Ploidie-Veränderung ist eine langsamere Zellteilung, nicht nur wegen der erschwerten molekularen Bedingungen für die Mitose, sondern auch aufgrund der größeren Menge an zu synthetisierender DNA.

Durch die Expression des viralen Proteins E6 wird der Zellzyklus im Übergang von G2 in die Mitose-Phase gehemmt. Erfolgt durch andere aberrante Protein-Aktivierungen die Einleitung der G1- oder Synthese-Phase, so kann der Zellzyklus an der Mitose-Phase vorbei mit der erneuten S-Phase weitergeführt werden (Clarke et al., 2001). Hierbei spielen die Aktivierung bestimmter Cyclin-abhängiger Kinasen (CDKs), ihre Inhibitoren und die Cycline eine Rolle.

#### *Chromosom 4*

In der CGH-Studie (Solinas-Toldo et al., 1997) wurde in den sehr frühen Passagen ein Verlust des Chromosoms 4 festgestellt. In dieser Studie ist dieser Verlust eher in wenigen Metaphasen erkennbar. An Zellen höherer Passagen durchgeführte LOH-Untersuchungen (loss of heterozygosity, Allelverlust) der HPK-Zellen zeigen jedoch, dass weiterhin eines der Allele nicht vorhanden ist. Mit der SKY-FISH kann auch in den frühen Passagen kein Verlust festgestellt werden. Es ist davon auszugehen, dass

sich nach dem Verlust das noch vorhandene Chromosom dupliziert hat. Hier zeigen sich die Grenzen der SKY wie auch der molekularen Zytogenetik allgemein. Im Gegensatz zu den molekularen Nachweismethoden kann sie diese Unterscheidung der Allele nicht leisten.

Die Arbeiten der Arbeitsgruppe Gynäkologische Molekularbiologie zeigen, dass der Verlust des Chromosoms 4, insbesondere von 4q35.1-->qter im Immortalisierungsprozess von Bedeutung ist. Durch funktionelle Analysen (Mikrozell-vermittelter Einzelchromosomentransfer, MMCT, nach Anderson et al., 1994) wurde gezeigt, dass der Transfer eines Chromosom 4 in 56% der HeLa-Zell-Hybride und 81% der HPKII-Zell-Hybride zu einem seneszenten Phänotyp führte. Des weiteren wurden Derivatvchromosom 4 verwendet, die aus bestrahlten Mikrozellen erzeugt wurden (Backsch et al., 2005). Keines der verwendeten Chromosom-4-Derivate enthielt den Bereich 4q35-->qter. Die verwendeten Derivate aus anderen zytogenetischen Regionen konnten jedoch nur in einem kleinen Anteil der Hybride Seneszenz auslösen. Daraus wurde geschlossen, dass dieser Bereich den gesuchten putativen Lokus eines Seneszenzgens enthält. Loss-of-heterozygosity (LOH)-Analysen und Interphasen-FISH konnten auch zeigen, dass dieser Bereich in bis zu 43% der untersuchten Zervixkarzinome deletiert ist (Backsch et al., 2005).

Die Versuche mit dem gesamten Chromosom 4 zeigen, dass Heterozygotität den Phänotyp beeinflussen kann.

Das Chromosom vermittelt nur Seneszenz bei Einbringen (mittels MMCT) in Zellen der Komplementationsgruppe B für Immortalität (Ning et al., 1991). In Zellen der anderen drei Komplementationsgruppen ist kein Effekt des Chromosoms zu beobachten. Auch Bertram und Mitarbeiter (Bertram et al., 1999 a+b) fanden einen Seneszenzgenloкус, genannt MORF 4 (mortality factor on chromosome 4) mittels MMCT des Chromosoms 4 und Klonieren des Lokus. Das Genprodukt MORF4 hat die Eigenschaften eines Transkriptionsfaktors.

Weitere klinische Studien belegen, dass der Lokus 4q35-->4qter in bis zu 70% der untersuchten squamösen Zervixkarzinome deletiert ist (Sherwood et al., 2000). In Adenokarzinomen wurde dieser Verlust nicht entdeckt, allerdings waren auch 2/3 der Fälle für das Primerpaar dieses Lokus nicht informativ. Das bedeutet, dass das amplifizierte Fragment auf beiden Chromosomen gleich lang ist.

Auch Zelllinien aus anderen Tumoren wie z.B. dem Prostatakarzinom weisen eine sehr kleine Deletion auf 4q28 auf (Matsui et al., 2005). Sollte sie auch in den untersuchten Zelllinien in der Studie von Backsch und Kollegen deletiert gewesen sein, so ist es möglich, dass die untersuchten Marker nicht eng genug nebeneinander lagen, um sie zu erkennen.

Kimura und Mitarbeiter fanden eine Assoziation zwischen dem Verlust von 4q und venöser Invasion von Magentumoren (Kimura et al., 2004).

### *Chromosom 10*

Folgend auf die CGH-Studie von Solinas-Toldo (Solinas-Toldo et al., 1997) und Mitarbeitern wurde in der MMCT-Studie von Poignée und Mitarbeitern (Poignee et al., 2001) nachgewiesen, dass der Verlust von 10p14-15 funktionell von Bedeutung ist. In allen Zelllinien fanden sich Veränderungen des Chromosoms 10. In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, wie der Verlust in den einzelnen Linien zustande kommt. Es handelt sich um unbalancierte Translokationen oder das Isochromosom 10q (HPKV). Vereinzelt wird auch nur der p-Arm des Chromosoms 10 als Marker nachgewiesen. Möglicherweise geht das Zerknicken dem Translozieren voraus. Als Folge werden die Fragmente aufgrund ihrer nicht kompletten Ausstattung mit Zentromer und Telomer durch einen Notfall-Reparatur-Mechanismus erkannt und auf ein anderes Chromosom transloziert. Aufgrund des seltenen Auftretens dieses Markers scheint jedoch sicher, dass das Zerknicken des Chromosom 10 ein frühes Ereignis ist.

In der Zelllinie HPKV-2 sind zwei verschiedene Chromosom-10-Derivate zu sehen: das Isochromosom 10q und eine Translokation t(5;10). Es ist schwierig zu beurteilen, ob dieses Phänomen seine Ursache in „jumping translocation“ also, springenden Translokationen zu suchen sind, oder die Klonalität der Zellen unterschiedliche Derivate hervorbringt.

In jedem Fall scheint der betroffene Bereich des Chromosoms 10 ein fragiler Bereich zu sein, der Brüche und anschließende Ligationen begünstigt.

Funktionelle Analysen von Tumorzelllinien aus der Prostata, der Lunge und der Leber zeigen, dass ein Telomerase-regulierendes Gen in der Region zu finden sein könnte (Fukuhara et al., 2001, Miura et al., 2001, Nishimoto et al., 2001). Auch in Tumoren des Kopf- und Nackenbereiches wurden Deletionen von 10p beobachtet (Singh et al., 2001).

In einer früheren Studie (Diplomarbeit Birgit Meyer, 2001) wurden zwei Tumore mittels Interphasen-FISH untersucht, die in der LOH-Analyse einen Verlust verschiedener 10p-Regionen gezeigt hatten. Die Ergebnisse dieser Studie konnten nur in Teilen bestätigt werden. Dies liegt daran, dass nicht dieselben Teile des Tumors verwendet werden konnten. Die LOH-Analyse funktioniert besser, wenn gefrierarchiviertes Gewebe verwendet wird, während in der Interphasen-FISH die Vorteile paraffineingebetteten Gewebes genutzt werden.

Die LOH-Analyse ergab nie einen 100%igen Verlust.

Solinas-Toldo und Mitarbeiter (Solinas-Toldo et al., 1997) zogen aus den Ergebnissen die Folgerung, dass die HPV-vermittelte Immortalität der HPK-Zellen durch einen frühen Verlust von 10p14-15 vermittelt wird. Dies würde in-vivo allerdings bedeuten, dass in einem Tumor alle Zellen den Verlust von mindestens einem Allel aufweisen.

Dies kann aber in Tumorgeweben nicht beobachtet werden. Es ist daher darauf zu schließen, dass der Verlust von 10p zwar häufig auftritt, aber keinem genauen Muster folgt und somit auch zu keinem festen oder frühen Zeitpunkt erfolgt (Poignée et al, 2001).

Es wird in wenigen Tumorarten ein genaues Muster der Progression zum Tumor beobachtet. Diese Tumore sind zumeist erblich bedingt (Albertson et al., 2003), wie z.B. Brusttumore oder Tumore des Dickdarms.

### *Chromosom 5*

Jumping translocations wurden in HeLa z.B. für die Chromosomen 5pter-->5qter beobachtet (Padilla-Nash et al., 2001). Ein Bruch eines Chromosoms kann unterschiedliche Auswirkungen auf die Expression der den Bruch umgebenden Gene haben. Davon hängt ab, ob eine Promotor-Region vom Gen getrennt wird, oder eine vor dem Gen liegende Sequenz, die die Expression attenuiert. Das Telomerase-Gen hTERT befindet sich auf 5p15.33. In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass viele der untersuchten HPK-Zelllinien und die primären Zellkulturen Veränderungen des Chromosom 5 aufweisen. Es bleibt zu untersuchen, ob dieser Locus amplifiziert ist oder als eine Folge des Bruchs eine Veränderung in der Expression dieses Gens zu finden ist. In einer Studie von Zhang und Mitarbeitern (Zhang et al., 2000) wurde eine Amplifikation des hTERT-Gens in 4 von 10 Zervixkarzinomen gefunden.

Neben der Telomerase enthält das Chromosom 5 auch mindestens ein Tumorsuppressorgen, wie z.B. das APC-Gen. APC steht für adenomatous polyposis coli. Es ist in hereditären wie in spontanen Colonkarzinomen sehr häufig deletiert oder durch Punktmutationen inaktiviert (Albuquerque et al., 2002).

### *Chromosom 3*

In der vorliegenden Studie konnte nicht in allen Linien Aberrationen des Chromosom 3 gefunden werden. HPKV-2 weist die Translokation t(1;3) auf, in HPKV-2 findet sich ein Verlust des gesamten Chromosoms im Zusammenhang mit einer t(3;5). Jedoch wird dieses Chromosom als genetische Veränderung für das Zervixkarzinom diskutiert und soll aus diesem Grund hier ebenfalls angesprochen werden.

In der LOH-Analyse von 58 invasiven Zervixkarzinomen und ihrer benachbarten CIN III-Läsionen konnten die Regionen 3p11-12 und 6p23 als häufig deletiert identifiziert werden, und zwar in den Tumoren wie auch in den CIN III (Rader et al., 1998).

Macville und Mitarbeiter (Macville et al., 1999) untersuchten HeLa-Zellen mittels SKY und CGH. Sie stellten heraus, dass das Chromosom 3 an verschiedenen Markerchromosomen beteiligt ist. Auch ist dabei ein Zugewinn an Chromosom 3-Sequenzen zu verzeichnen.

Heselmeyer und Mitarbeiter (Heselmeyer et al., 2003) hatten mittels CGH eine große Zahl von Amplifikationen von 3q in CIN und Zervixkarzinomen festgestellt und die Schlußfolgerung gezogen, dass dieses Ereignis der Progression zum Tumor vorausgeht. An Dünnschichtpräparaten von 68 zervikalen Abstrichen konnten sie mittels Interphasen-FISH nachweisen, dass hochgradige Dysplasien in der Zervix in großer Zahl Amplifikationen des humanen Telomerase Gens hTR/ TERC besitzen. Diese traten korreliert zum Grad der Dysplasie häufiger wie auch in stärkerem Maße auf. Dellas und Mitarbeiter (Dellas et al., 2002) untersuchten Zervixkarzinome mit der CGH und stellten die Aberrationen in Korrelation mit der Überlebenszeit der Patientin. Sie konnten keine Korrelation zur Amplifikation von 3q feststellen. Möglicherweise ist jedoch der amplifizierte Bereich in vielen Tumoren so klein, dass die Auflösung der CGH nicht ausreicht. Durch CGH kann der genomische Status in einzelnen Zellen nicht identifiziert werden. Möglicherweise sind aber gerade in kleineren Läsionen einzelne Zellen für die Progression der Läsion bestimmend. Heselmeyer und Mitarbeitern (Heselmeyer et al., 2003) ermittelten daher eine Mindestzahl von Zellen mit 3q-



Amplifikation in einem Abstrich die auf eine maligne Läsion der Zervix hinweisen. Die Studie muß allerdings um eine größere Fallzahl erweitert werden.

In zervikalen und renalen Tumorzelllinien führt der MMCT eines Chromosom 3 hingegen zum seneszenten Phänotyp und zur Repression der Telomerase (Oshimura et al., 1997). Dabei sind jedoch für die unterschiedlichen Zellen unterschiedliche Loci auf dem Chromosom 3 verantwortlich (Tanaka et al., 2005).

Singh und Mitarbeiter untersuchten 12 Zelllinien aus Tumoren des Kopf- und Nackenbereiches mittels CGH und SKY (Singh et al. 2001). Sie fanden dabei eine Amplifikation von 3q in vielen Zelllinien, die dann mittels FISH genauer eingegrenzt wurden. Dabei fanden sie in 8 der 12 Zelllinien Amplifikationen mit der kleinsten überlappenden Region, die den Bereich um 3q26 umspannte.

#### *Chromosom 8*

Das Chromosom 8 wurde in den HPK-Zellen als häufig in erhöhter Kopienzahl oder strukturell aberrant (z.B. das Isochromosom 8q) gefunden. Lyng und Mitarbeiter untersuchten verschiedene Bereiche mehrerer Tumore und stellten dabei heterogene und homogene Aberrationen gegenüber. Sie stellten dabei außerdem fest, dass die Amplifikation von 8q die Amplifikationen 11qcen-13, 19q und 22q selten nebeneinander auftreten, einander also verzichtbar machen (Lyng et al. 2004).

#### *Chromosom 20*

In drei der vier HPK-Zelllinien fand sich die Amplifikation von Chromosom 20. Die erhöhte Kopienzahl von Chromosom 20 wurde mit dem HPV 16 E7 abhängigen Überwinden zellulärer Seneszenz assoziiert (Savelieva et al., 1997). Auch in Magentumoren wurde diese Alteration gefunden und mit dem Muster des Tumor-Stroma-Verhältnisses in Zusammenhang gebracht (Kimura et al., 2004). In Magentumoren ist dies sogar die häufigste chromosomale Veränderung. Auf dem kurzen Arm befindet sich das Gen des PCNA (proliferating cell nuclear antigen). Dieses Protein ist eine wesentliche Komponente der Replikationsgabel.

#### *Chromosom 22*

Solinas-Toldo et al. (1997) fanden häufige Amplifikationen des Chromosom 22. Dies wurde mittels SKY in den HPK-Zellen nicht bestätigt. Auch die primären Zelllinien wiesen keinerlei derartige Aberrationen auf.

Freier et al. (2005) grenzten mittels CGH, Array-CGH und Interphasen-FISH einen Bereich 22q13 ein, der in Tumoren der Mundschleimhäute und der Speicheldrüsen sehr häufig amplifiziert ist. Es finden sich Hinweise auf vier Gene in diesem Bereich, die die Metastasierung durch ihre erhöhte Expression fördern könnten. Eine Bedeutung dieses Bereiches für Tumorprogression ist daher denkbar.

#### *Aberrationen, weitere Studien*

Verschiedenste Studien haben chromosomale Veränderungen unter Verwendung verschiedener Methoden untersucht. Jedoch können weder CGH- noch LOH-Studien trotz häufiger nachgewiesener Verluste in den untersuchten Geweben Gene eingrenzen, deren Verlust bzw. geringere Expression eine Rolle spielen.

Bereits beschriebene Veränderungen wurden in der vorliegenden Studie gesehen, wie z.B. das Zerbrechen und die Amplifikation des Chromosom 5. Das Chromosom 20 liegt ebenfalls häufig in höherer Kopienzahl vor. In dieser Studie zeigen die Chromosomen 4 und 10 lediglich balancierte Translokationen. Hidalgo und Mitarbeiter etablierten vier neue Zelllinien, die mittels CGH untersucht werden konnten. Diese vier Zelllinien waren ausschließlich HPV-18 positiv. Drei der vier Zelllinien zeigten Verluste der Region um 1qter- p32 oder p35 auf der einen Seite und alle vier zeigten Zugewinne der Region 1q22-31 auf der anderen Seite. Interessanterweise waren auch in diesen Zelllinien Verluste auf dem Chromosom 4 und Zugewinne von Chromosom 5-Regionen zu sehen (Hidalgo et al., 2003).

#### *HPV-Integration*

Die Integration von HPV in das Genom des Wirtes wird häufig als ein entscheidendes Ereignis im Übergang von niedrig- zur höhergradigen Läsion vermutet. Hopman und Kollegen (2004) untersuchten daher die Korrelation zwischen Stadium, Expression des Proliferationsmarkers Ki-67, HPV-Integration und dem Auftreten von numerischen Aberrationen anhand von Interphasen-FISH mit drei Zentromer-Sonden. Sie konnten feststellen, dass je höher das Stadium der Läsion war, die Häufigkeit und die Aneuploidie der Zellen zunahm.

Szuhai et al. (2000) untersuchten die HPV-positive Zelllinie SiHa und fand innerhalb dieser Zelllinie aus der Zervix allein vier unterschiedliche Integrationsorte auf dem Chromosom 13. In derselben Arbeitsgruppe (Brink et al., 2002) wurden nach Kurzzeitkultur in 5 verschiedenen Zervixkarzinomen 4 verschiedene Integrationsorte nachgewiesen. 2 Tumore zeigen die HPV-Integration an 8q24. Auch hier ist die Art der

Integration verschieden: Ein Tumor zeigt den Verlust eines kompletten Chromosoms 8, das andere hat HPV integriert, ist aber ansonsten intakt. In dem anderen Tumor ist der Integrationsort gleichzeitig Bruchpunkt für eine Translokation t(3;8)(p12;q24). Es wird jedoch vielfach beobachtet, dass der Integrationsort an fragilen Stellen des Genoms stattfindet, ebenso wie Translokationen und Brüche (Thorland et al., 2000). Beispielsweise ist die „common fragile site“ (CFS) auf 3p14.2 häufig der Bruchpunkt für Translokationen in Tumoren (Corbin et al., 2002). Das betroffene Gen ist in Tumoren in Brust, Ovarien, Pankreas, Ösophagus, Niere und Dickdarm häufigen Veränderungen unterworfen. Es kodiert für eine Hydrolase, die in der Spaltung von Diadenosin-Triphosphaten beteiligt ist.

Koopman und Mitarbeiter hatten 1999 bereits neu etablierte Zelllinien aus Zervixkarzinomen mittels COBRA-FISH auch Karyotyp und HPV-Integrationslokus untersucht. Auffällig ist hier, dass die Modalzahlen und Zahl der Aberrationen pro Zelllinie stärker auf Aneuploidien hinweisen (Koopman et al., 1999).

In der vorliegenden Studie wurden keine Integrationsorte bestimmt. Die Auflösung der Methode läßt keinen Abgleich mit bekannten fragilen Stellen zu. Häufig ist der Bruchpunkt jedoch im Bereich des Zentromers.

### *Bedeutung der Aberrationen*

Einmal erworbene Aberrationen müssen nicht unbedingt in der gesamten weitergehenden Teilung eine Rolle spielen. In allen beobachteten Zelllinien wurde eine fortschreitende Heterogenität der Karyotypen festgestellt. Translokationen, die in der frühen Passage in ihrer Häufigkeit um die 100% ausmachten, wurden später nur noch in bis zu 70% gesehen, auch in einer unregelmäßigen Verteilung, wenn mehrere translozierte Marker auftraten (HPKV-2).

Es ist nicht sicher, ob eine Deletion von chromosomalen Bereichen tatsächlich zu einer verminderten Expression bzw. eine Amplifikation zu einer verstärkten Expression führt. Es gibt zahlreiche Mechanismen, die die Expression unterbinden, dazu gehört auch die Hypermethylierung von Promotorsequenzen, als Folge einer fehlerhaften Aktivität der Methyltransferasen.

Die Expression eines Proteins muß auf funktioneller Ebene keine Folgen für die Zelle haben. Ein Beispiel hierfür sind die Proteine p53 oder p16 in Zervixkarzinomen. Letzteres wird auch immunhistochemisch als Surrogatmarker für die Prognose von CIN-Läsionen verwendet (Klaes, 2001, Crum, 2003).

Cheung und Mitarbeiter untersuchten Deletionen, die Mutationshäufigkeit und den Methylierungszustand des PTEN-Gens, das auf 10q23.3 lokalisiert ist und eine Rolle in der Modulation des Zellzyklus und der Apoptose spielt. Sie zeigen, dass weder Mutation noch Deletion für den Verlust der Expression dieses Gens eine Rolle spielt, sondern dass meist die Hypermethylierung die Ursache ist (Cheung et al., 2004). Die Expression des Gens wurde durch Immunhistochemie nachgewiesen. Diese Studie zeigt an einer sehr kleinen Fallzahl, dass der genetische Zustand des Genoms allein nicht ausreicht, um auf die Expression der Gene schlußfolgern zu können. Auch Punktmutationen, die in einem zytogenetischen Ansatz nicht sichtbar sind, können das Stilllegen eines Gens zur Folge haben. Das Beispiel der Telomerase zeigt jedoch auch, dass selbst vollständig prozessierte Proteine nicht wirksam werden müssen.

Es wird vermutet, dass sich geeignete zytogenetische Marker eher in Amplifikationen finden (Albertson et al., 2003). Translokationen zeigen vielleicht Beteiligungen bestimmter Chromosomen, jedoch ist es in soliden Tumoren unwahrscheinlich, dass sie dann immer denselben Bruchpunkt zeigen. Tumore des hämatopoietischen Systems zeigen aufgrund der ständigen Rekombination der Gene des Immunsystems eine Prädestination. Ein Beispiel hierfür ist das Burkitt-Lymphom, das als charakteristische Aberration eine  $t(8;14)(q24;q32)$  besitzt. Hierdurch wird das Onkogen MYC an das Gen der schweren Kette des Immunglobulins transloziert. Durch die Expression der Immunglobuline liegt dann auch das MYC funktionsfähig vor und sorgt für die Proliferation der Lymphozyten (Haluska et al., 1988).

### *Komplementation*

Ein weiterer Hinweis auf die Schwierigkeit, Marker zu finden, ergeben sich durch die Präsenz der Komplementationsgruppen: Trotz unterschiedlicher chromosomaler Aberrationen weisen Zellen doch gleiche Blockaden auf, die durch Fusionen mit Zellen der gleichen Komplementationsgruppe bewiesen werden konnte (Pereira-Smith et al., 1988). In dieser Studie wurden immortale Zelllinien unterschiedlicher Herkunft miteinander fusioniert. Da sich nach Fusion einer immortalen und einer nicht-immortalen Zelle der Phänotyp der Immortalität rezessiv verhält, wurde überprüft, ob sich diese Tumorzelllinien in ihren Aberrationen derartig verändern, dass sich diese gegenseitig aufheben. Dabei wurden die verwendeten Zelllinien in vier verschiedene Gruppen eingeteilt. Zelllinien, die sich nicht komplementieren gehören einer Gruppe an. Da sich SV-40-positive Zelllinien in der Komplementationsgruppe A wiederfanden,

wurde geschlossen, dass ein Virus in Zellen unterschiedlicher Wirte dieselben Defekte auslöst. HeLa ist der Komplementationsgruppe B für Immortalität zugeordnet, wie auch HPKIA (Seagon et al., 1994). Anhand der chromosomalen Aberrationen lässt sich die Art des Defektes nicht erkennen.

Dies bedeutet, dass der Karyotyp meistens keine Aussage über den tatsächlichen Punkt der Signalkaskaden-Blockierung gibt, die für die Progression zum Tumor verantwortlich ist.

Ein weiterer Punkt ist, dass viele der festgestellten Aberrationen als „noise“, also „Hintergrund“ zu bezeichnen sind (Albertson et al., 2003).

Außerdem ist eine Duplikation eines Allels möglich, dessen anderes Allel vorher verloren gegangen war. Dies lässt sich anhand der Molekularen Zytogenetik nicht feststellen, denn die Schwesterchromosomen sind nicht unterscheidbar. Allele können mit der LOH-Analyse (loss of heterozygosity) unterschieden werden. Hierbei wird die Länge der polymorphen repetitiven Sequenzen mittels einer Mikrosatelliten-PCR bestimmt. Sind zwei Allele vorhanden, so gibt es in informativen Fällen auch zwei Banden im Gel. Die Häufigkeit des Allels lässt sich mittels dieser molekularbiologischen Methode nicht bestimmen.

#### *Phänomen multiradiale Chromosomen und andere Phänomene*

Eine weitere interessante Veränderung zeigt die Zelllinie HPKV-2 (siehe Abb. 3-9). In der Passage 47 konnten vereinzelt multiradiale Chromosomen aus unterschiedlichen Chromosomen beobachtet werden. Laut Ehrlich und Mitarbeiter ist die fehlende Funktion der Methyltransferase DNMT3B (DNA Methyltransferase 3B) für die Ausbildung multiradialer Chromosomen 1q und 16q verantwortlich. Zusätzliche Veränderungen sind Dekondensation der DNA-Bereiche und Rearrangements. Die Sat2 Sequenzen, welche hauptsächlich auf den juxtazentromerischen Bereichen der Chromosomen 1 und 16 zu finden sind, werden durch diese Methyltransferase methyliert. Dies wurde durch die karyotypische Untersuchung von Lymphozyten gezeigt, deren Spender einen genetischen Defekt dieser Enzyme besitzen und unter dem ICF-Syndrom leiden. ICF steht für Immundeficiency, centromeric region instability, facial anomalies. Es handelt sich hierbei um eine seltene, autosomal rezessive Erbkrankheit (Ehrlich, 2002).

Allerdings zeigen auch normale Fibroblasten oder Zellen aus Chorionzotten gesunder Föten mit fortschreitender Zellkultur derartige Veränderungen in der Chromosomenstruktur.

Ob dieses Phänomen tatsächlich durch das Fehlen dieser Methyltransferase verursacht wird, kann im Rahmen dieser Studie nicht bewiesen werden. Jedoch kann darauf hingewiesen werden, dass das Chromosom 16q, auf dem das Gen dieses Protein lokalisiert ist in vielen dieser Zellen deletiert ist, so auch im gezeigten Beispiel. Hier kann zusätzlich bereits die Hypomethylierung des Genlokus eine Rolle spielen.

Für die Karyotypisierung wurde diese Formation unterschiedlicher Chromosomen nicht berücksichtigt, das heißt, zusammenhängende Chromosomen wurden auseinander-geschnitten und als einzelne Chromosomen betrachtet. Das Phänomen ist möglicherweise an der Bildung weiterer struktureller Aberrationen beteiligt.

Als weiteres Phänomen auf dem Weg zur Translokation sehen Gisselsson und Mitarbeiter Anaphase-Brücken und Chromatinbrücken zwischen Interphase-Nuklei durch unvollständige Chromatidtrennungen. Sie können neben Chromosom-Brüchen auch Ringchromosomen und Dizentrische Chromosomen zur Folge haben (Gisselsson et al., 2000).

#### *Die Problematik der SKY*

Die extremen Fälle der Polyploidie zeigen eine Grenze der SKY-FISH auf: Es war möglich, alle Chromosomen in einem Bild aufzunehmen, allerdings lediglich dank der Tatsache, dass sie relativ klein und stark kondensiert waren. Anzustreben ist normalerweise die Präparation von möglichst langen Chromosomen, da die Methode dann eine bessere Auflösung bietet. Lange Chromosomen in dieser Zahl hätten allerdings nur überlappt. Somit wären sie für die SKY-FISH nicht verwendbar gewesen, oder hätten bei guter Streuung nicht in das Blickfeld gepaßt. Die Aufnahme wäre nicht möglich gewesen.

Eine weitere, wenn auch technisch sehr aufwändige Lösung des Problems der zu geringen Auflösung ist die SCAN-Methode (spectral colour banding), Sie basiert auf dem gleichen Prinzip der Sondenmarkierung, Detektion und Visualisierung wie die SKY, unterscheidet aber nicht einzelne Chromosomen, sondern die Banden eines einzelnen Chromosoms (Kakazu et al., 2003). Fraglich allerdings ist, ob diese Methode nicht denselben Problemen unterliegt wie die SKY, wenn die unterschiedlich gefärbten Regionen zu dicht aneinander liegen, wie es bei niedriger Auflösung durchaus der Fall

ist. In diesem Fall ist das Mischen und fehlerhafte Zuordnen der Regionen die Folge (Lee et al., 2001). Zudem bietet die SCAN-Methode nicht den gewünschten Überblick über die Veränderungen des gesamten Genoms wie es die SKY leistet.

### *Schlußfolgerung*

Es konnten verschiedenste Veränderungen detektiert werden, die jedoch in den unterschiedlichen Zelllinien sehr heterogen waren. Die Beteiligung einzelner Chromosomen mit Bruchpunkten an unterschiedlichen Regionen war jedoch erkennbar. Aufgrund von Schwierigkeiten in der Methodik konnten auch die im Tumor vorkommenden Aberrationen nicht detektiert werden. Lediglich zwei Kulturen wuchsen aus. Die Ergebnisse in der SKY-FISH war sicher nicht repräsentativ für die Karyotypen in den Zellen des Tumors, denn es zeigte sich, dass lediglich jeweils ein Klon bis zu der Chromosomenpräparation geführt werden konnte. Es ist nicht zu vernachlässigen, dass durch die Zellkultur bestimmte Klone selektiert werden.

Als in der Literatur wenig beschriebenes Phänomen kann der Ploidie-Grad der durch HPV immortalisierten Keratinozyten erwähnt werden. Die Modalzahl wird mit steigender Passagierung wieder geringer, wahrscheinlich aufgrund eines Wachstumsnachteils. Jedoch spielt Polyploidie in der Generierung der Aberrationen in der Karzinogenese eine Rolle.

Es sind weitere Untersuchungen notwendig, um die klinische Bedeutung aller gefundenen Aberrationen zu bestimmen. Es ist unter Umständen notwendig zu bedenken, dass nicht nur eine Veränderung allein zur Progression einer CIN zum Tumor eine Rolle spielen muß. Möglicherweise sollte bei der Entwicklung eines Markers berücksichtigt werden, dass unterschiedliche Veränderungen zu den gleichen Wachstumseigenschaften führen können.

## 5 Literatur

---

### **Albertson, Collins, McCormick, Gray**

Chromosome aberrations in solid tumors  
Nature Genetics, Aug., 34 (4); 269-376, 2003

---

### **Albuquerque, Breukel, van der Luij, Fidalgo, Lage, Slors, Leitão, Fodde, Smits**

The “just right” signaling model: APC somatic mutations are selected based on a specific level of activation of the beta-Catenin signaling cascade

Human Molecular Genetics, 11, no. 13, 1549-1560, 2002

---

### **Anderson, Stanbridge**

Microcell-mediated chromosome transfer: Selective transfer and retention of single human chromosome into recipient cells of choice

Cell Biology: A laboratory handbook, Academic press, 1994

---

### **Andreassen, Margolis**

2-Aminopurine overrides multiple cell cycle checkpoints in BHK cells

PNAS, 89, 2272-2276, 1992

---

### **Backsch, Rudolph, Kühne-Heid, Kalscheuer, Bartsch, Jansen, Beer, Meyer, Schneider, Dürst,**

A Region on human chromosome 4 (q35.1-->qter) induces senescence in cell hybrids and is involved in cervical carcinogenesis

Genes, Chromosomes and Cancer, 43, 260-272, 2005

---

### **Barreton, Müller, Wirtz, Murken, Arnholdt,**

Numerische Chromosomenaberrationen in Abortmaterial

Der Pathologe, 19:120-128, 1998:

---

### **Begg, Sprong, Balm, Martin**

Premature chromosome condensation and cell separation studies in biopsies from head and neck tumors for radiosensitivity prediction

Radiotherapy and Oncology, 62, 335-343, 2002

---

### **Benson Chanda, Ausubel, Brent, Kingston, Moore, Seidmann, Smith, Struhl (Hrsg.)**

Current Protocols in molecular biology

Wiley, 2000

---

### **Bertram, Berube, Hang-Swanson, Ran, Leung, Bryce, Spurgers, Bick, Baldini, Ning, Clark, Parkinson, Barrett, Smith, Pereira-Smith**

Identification of a gene that reverses the immortal phenotype of a subset of cells and is a member of a novel family of transcription factor-like genes.

Molecular Cell Biology, Feb;19(2):1479-85, 1999

---

### **Bertram, Berube, Swanson, Pereira-Smith**

Assembly of a BAC contig of the complementation group B cell senescence gene candidate region at 4q33-q34.1 and identification of expressed sequences.

Cell Biology, Feb;19(2):1479-85, 1999

---

### **Bertz, Hentschel, Stabenow, Giersiefen, Kaatsch, Stegmaier, Haberland, Katalimic, Ziegler**

Krebs in Deutschland, Häufigkeiten und Trends

Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister i Deutschland e.V. in Zusammenarbeit mit dem Robert Koch Institut, 4. überarbeitete Auflage, Saarbrücken 2002

---



---

**Bhatia, Balis, Yarmush, Toner**

Effect of cell-cell interactions in preservation of cellular phenotype: cocultivation of hepatocytes and nonparenchymal cells.  
FASEB, Nov;13 (14):1883-1900, 1999

---

**Bleeker, Hogewoning, Voorhorst, van den Brule, Berkhof, Hesselink, Lettink, Starink, Stoof, Snijders, Meijer**

HPV-associated flat penile lesions in men of a non-STD hospital population: less frequent and smaller in size than in male sexual partners of women with CIN  
International Journal of Cancer, 113, 36-41, 2005

---

**Böcking**

Abklärung plattenepithelialer Dysplasien mittels DNA-Bildzytometrie  
Deutsches Ärzteblatt 95, 12, 1998

---

**Brink, Wiegant, Szuhai, Tanke, Kenter, Fleuren, Schuurig, Raap**

Simultaneous Mapping of human Papillomavirus integration sites and molecular karyotyping in short-term cultures of cervical carcinomas by using 49-color combined binary ratio labeling fluorescence in situ hybridization  
Cancer Genetics and Cytogenetics 134, 145-150, 2002

---

**Bulten, Poddighe, Robben, Gemmink, de Wilde, Hanelaar**

Interphase cytogenetic analysis of cervical neoplasia  
American Journal of Pathology, 152, 495-503, 1998

---

**Burke, Carle, Olson**

Cloning of large segments of exogenous DNA into Yeast by means of artificial chromosome vectors  
Science, 236; 806-812, 1987

---

**Butel**

Viral carcinogenesis: revelation of molecular mechanisms and etiologie of human disease  
Carcinogenesis, 21, 3, 405-426, 2000

---

**Canavan, Doshi**

Cervical Cancer  
American Family Physician, 61 (5), 1369-1375, 2000

---

**Cheung, Lo, Yim, Chan, Heung, Chan, Cheung, Chung, Wong**

Epigenetic and genetic alternation of PTEN in cervical neoplasm  
Gynecologic Oncology, 93, 621-627, 2004

---

**Clarke, Chetty**

Cell Cycle Aberrations in the pathogenesis of squamous cell carcinoma of the uterine cervix  
Gynecologic Oncology, 82, 238-246, 2001

---

**Corbin, Neilly, Espinosa, Davis, McKeithan, Le Beau**

Identification of unstable sequences within the common fragile site at 3p14.2: implications for the mechanism of deletions within fragile histidine triad Gene/ Common fragile site at 3p14.2 in tumors  
Cancer Research, 62, 3477-3484, 2002

---

**Cottage, Downen, Roberts, Pett, Coleman, Stanley**

Early genetic events in HPV immortalized keratinocytes  
Genes, chromosomes and Cancer 30, 72-79, 2001

---

**Crum, Abbott, Quade**

Cervical Cancer Screening: From the Papanicolaou Smear to the Vaccine era

Journal of Clinical Oncology, 21, no. 10, 224-230, 2003

---

**de Villiers, Fauquet, Broker, Bernard, zur Hausen**

Classification of papillomaviruses.

Virology, Jun 20;324(1):17-27, 2004

---

**Dellas, Torhorst, Mihatsch, Moch**

Genomische Aberrationen beim invasiven Zervixkarzinom

Geburtshilfe und Frauenheilkunde, 62, 458-464, 2002

---

**Dürst, Seagon, Wandschura, zur Hausen, Strahlung, Bullerdiek**

Malignant Progression of an HPV16-immortalized Human Keratinocyte Cell Line (HPK1A) In Vitro

Cancer Genet Cytogenet 85: 105-112, 1995

---

**Ehrlich**

The ICF syndrome, a DNA methyltransferase 3B deficiency and immunodeficiency disease.

Clinical Immunology, Oct;109(1):17-28., 2003

---

**Fan, Siu, Jung, Xu**

Sensitivity of multiple color spectral karyotyping in detecting small interchromosomal rearrangements

Genetic Testing, 4(1):9-14, 2000

---

**Fearon, Vogelstein**

A genetic model for colorectal tumorigenesis

Cell, 61, 759-676, 1990

---

**Ferber, Eilers, Schuurin, Fenton, Fleuren, Kenter, Szuhai, Smith, Raap, Brink**

Positioning of cervical carcinoma and Burkitt lymphoma translocation breakpoints with respect to the human papillomavirus integration cluster in FRA8C at 8q24.13

Cancer, Genetics and Cytogenetics, 154, 1-9, 2004

---

**Freier, Flechtenmacher, Walch, Ohl, Devens, Burke, Hassfeld, Lichter, Joos, Hofele**

Copy number gains on 22q13 in adenoid cystic carcinoma of the salivary gland revealed by comparative genomic hybridization and tissue microarray analysis

Cancer Genetics and Cytogenetics, 159, 89-95, 2005

---

**Fukuhara, Maruyama, Nomura, Oshimura, Kitamura, Sekiya, Murakami**

Functional evidence for the presence of tumor suppressor gene on chromosome 10p15 in human prostate cancers

Oncogene, 20, 314-319, 2001

---

**Gisselsson, Petterson, Höglund, Heidenblad, Gorunova, Wiegant, Mertens, Cin, Mitelman, Mandahl**

Chromosomal breakage-fusion-bridge events cause genetic intratumor heterogeneity

PNAS, 97, 5357-5362, 2000

---

**Haluska, Tsujimoto, Croce**

The t(8;14) breakpoint of the EW 36 undifferentiated lymphoma cell line lies 5' of MYC in a region prone to involvement in endemic Burkitt's lymphoma

Nucleic Acids Research, 16, 5, 1988

---

---

**Hamon-Benais, Ingster, Terris, Couturier-Turpin, Bernhein, Feldman**

Interphase cytogenetic studies of human hepatocellular carcinomas by fluorescence in-situ hybridization

Hepatology, 429-435, 1996

---

**Hanselaar, Voois, Oud, Pahlplatz, Beck**

DNA ploidy patterns in cervical intraepithelial neoplasia grade III, with and without synchronous invasive squamous cell carcinoma

Cancer, 62:2537-2545, 1988

---

**Hennig**

Genetik

Springer Verlag, 1995

---

**Herman**

Hypermethylation of tumor suppressor genes in cancer

Seminars in cancer biology, 9, 359-367, 1999

---

**Heselmeyer, Macville, Schröck, Blegen, Hellström, Shah, Auer, Ried**

Advanced-stage cervical carcinomas are defined by a recurrent pattern of chromosomal aberrations revealing high genetic instability and a consistent gain of chromosomal arm 3q

Genes, Chromosomes and Cancer, 19: 233-240, 1997

---

**Heselmeyer-Haddad, Janz, Castle, Chaudhri, White, Wilber, Morrison, Auer, Burroughs, Sherman, Ried**

Detection of Genomic Amplification of the Human Telomerase Gene (TERC) in Cytologic Specimens as a Genetic Test for the Diagnosis of Cervical Dysplasia

American Journal of Pathology, 163, 4, 2003

---

**Hidalgo, Monroy, Ma Arana, Taja, Vázquez, Salcedo**

Chromosomal imbalances in four new uterine cervix carcinoma derived cell lines

BioMed Central., 3,:8, 2003

---

**Hopman, Smedts, Dignef, Ummelen, Sonke, Mravunak, Vooijs, Speel, Ramaekers**

Transition of high-grade cervical intraepithelial neoplasia to micro-invasive carcinoma is characterized by integration of HPV 16/18 and numerical chromosome abnormalities

Journal of Pathology, 202, 23-33, 2004

---

**Huibregtse, Scheffner**

Mechanisms of tumor suppressor protein inactivation by the human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins

Seminars in Virology, 5, 357-267, 1994

---

**Inokuchi, Hamaguchi, Taniwaki, Yamaguchi, Tanosaki, Dan**

Establishment of a cell line with AMLLI-MTG8, TP53, and TP73, abnormalities from acute myelogenous leukemia

Genes, chromosomes and Cancer, 32, 182-187, 2001

---

**Kakazu, Bar-Am, Hada, Ago, Abe**

A new chromosome banding technique, spectral color banding (SCAN), for full characterization of chromosomal abnormalities

Genes, chromosomes and Cancer, 37, 412-416, 2003

---

---

**Kersemaekers, van de Vijver, Kenter, Fleuren**

Genetic alterations during the progression of squamous cell carcinomas of the uterine cervix

Genes, Chromosomes and Cancer, 26, 346-354, 1999

---

**Kimura, Noguchi, Kawahara, Kashima, Daa, Yokoyama**

Genetic alterations in 102 primary gastric cancers by comparative genomic hybridization: gain of 20q and loss of 18q are associated with tumor progression

Modern pathology, 17, 1328-1337, 2004

---

**Klaes, Friedrich, Spitkovsky**

Overexpression of p16(INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri

International Journal of Cancer 92, 276-284, 2001

---

**Knippers**

Molekulare Genetik

Thieme Verlag, 7. durchgesehene und korrigierte Auflage, 1997

---

**Knudson**

Mutation and cancer

Proc. Natl. Sci. USA, 68, 4, 820-823, 1971

---

**Koopman, Szuhai, van Eendenburg, Bezrookove, Kenter, Schuurig, Tanke, Fleuren**

Recurrent Integration of human Papillomaviruses 16, 45, and 67 near Translocation Breakpoints in New Cervical Cancer Cell Lines

Cancer research 59, 5615-5624, 1999

---

**Lee, Gisselson, Jin, Nordgren, Ferguson, Blennow, Fletcher, Morton**

Limitations of chromosome classification by multicolor karyotyping

American Journal Genetics 68, 1043-1047, 2001

---

**Lyng, Beigi, Svendsrud, Brustugun, Stokke, Kristensen, Sundf r, Sk nsberg, de Angelis**

Intratumor chromosomal heterogeneity in advanced carcinomas of the uterine cervix

International Journal of Cancer, 111, 358-366, 2004

---

**Macville, Schröck, Padilla-Nash, Keck, Ghadmi, Zimonjik, Popescu, Ried**

Comprehensive and definitive molecular cytogenetic characterization of HeLa Cells by spectral karyotyping

Cancer research, 59, 141-150, 1999

---

**Macville, Veldman, Padilla-Nash, Wangsa, O'Brien, Schröck, Ried**

Spectral karyotyping, a 24-colour FISH technique for the identification of chromosomal rearrangement

Histochemical cell Biology 108, 299-305, 1997

---

**Magnusson, Lichtenstein, Gyllensten**

Heritability of cervical tumours

International Journal of Cancer, 88 (5); 698-701, 2000

---

**Matsui, LaDuca, Rossi, Nowak, Cowell**

Molecular characterization of a consistent 4.5-megabase deletion at 4q28 in prostate cancer cells

Cancer Genetics and Cytogenetics, 159, 18-25, 2005

---

---

**Meyer**

Diplomarbeit

September 2001

---

**Miura, Onuki, Rath, Virmani, Nakamoto, Kishimoto, Murawaki, Kawasaki, Hasegawa, Oshimura, Travis, Gazdar**

hTr repressor-related gene on human chromosome 10p15.1

British Journal of Cancer, 85, 1510-1514, 2001

---

**Ning, Weber, Killary, Ledbetter, Smith, Pereira-Smith**

Genetic analysis of indefinite division in human cells: evidence for a cell senescence-related gene(s) on human chromosome 4

PNAS, 8, 5635-5639, 1991

---

**Nishimoto, Miura, Horikawa, Kugoh, Murakami, Hirohashi, Kawasaki, Gazdar, Shay, Barrett, Oshimura**

Functional Evidence for a telomerase repressor gene on human chromosome 10p15.1

Oncogene, 20., 828-835, 2001

---

**Olaharski, Eastmond**

Elevated levels of tetraploid cervical cells in human papillomavirus-positive papanicolaou smears diagnosed as atypical squamous cells of undetermined significance

Cancer (Cancer Cytopathology) 102, 192-199, 2004

---

**Oshimura, Barret**

Multiple pathways to cellular senescence: role of telomerase repressors

European Journal of Cancer, 33, 5, 710-715, 1997

---

**Östör**

Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review

International Journal of Gynecological pathology, 12, 186-192, 1993

---

**Padilla-Nash, Heselmeyer-Haddad, Wangsa, Zhang, Ghadimi, Macville, Augustus, Schröck, Hilgenfeld, Ried**

Jumping Translocations are common in solid tumor cell lines and result in recurrent fusions of whole chromosome arms

Genes, chromosomes and Cancer, 30: 349-363, 2001

---

**Pang, Wong, Lai, To, Lau, Johnson**

Consistent Chromosome 10, rearrangements in four newly established human hepatocellular carcinoma cell lines

Genes, chromosomes and Cancer, 33, 150-159, 2002

---

**Parkin, Bray, Ferlay, Pisani**

Global cancer statistics, 2002

CA Cancer J Clin, Mar-Apr;55(2):74-108, 2005

---

**Pasonen-Seppanen, Karvinen, Torronen, Hyttinen, Jokela, Lammi, Tammi, Tammi**

EGF upregulates, whereas TGF-beta downregulates, the hyaluronan synthases Has2 and Has3 in organotypic keratinocyte cultures: correlations with epidermal proliferation and differentiation.

J Invest Dermatology, Jun;120(6):1038-44, 2003

---

**Pereira-Smith, Smith**

Genetic analysis of indefinite division in human cells: Identification of four complementation groups  
PNAS, 85, 6042-6046, 1988

**Perry, Tonk, McIntire White**

Interphase cytogenetic (In-situ-hybridization) analysis of astrocytomas using archival, formalin-fixed, paraffin-embedded tissue and nonfluorescent light microscopy  
Anatomic pathology, 108, 2, 166-174, 1997:

**Poignée, Backsch, Beer, Wagenbach, Stanbridge, Schneider, Dürst**

Evidence for a senescence gene locus within the chromosomal region 10p14-15,  
Cancer Research, 61, 7118-7121, 2001

**Rader, Gerhard, O'Sullivan, Li, Li, Liapis, Huettner**

Cervical intraepithelial Neoplasia III Shows frequent allelic loss in 3p and 6p  
Genes, Chromosomes and Cancer 22, 57-65, 1998

**Rao, Arias-Pulido, Lu, Harris, Vargas, Zhang, Narayan, Schneider, Terry, Murty**

Chromosomal amplifications, 3q gain and deletions of 2q33-q37 are the frequent genetic changes in cervical carcinoma  
BMC Cancer, Feb 6;4:5. 2004

**Rao, Harris, Lu, Li, Mok, Lau**

Multicolor spectral karyotyping of serous ovarian adenocarcinoma  
Genes, Chromosomes and Cancer, 33; 123-132, 2002

**Reichert**

Customized probes for fluorescence in situ hybridisation (FISH) from various sources- a universal and fast PCR-based protocol using the Expand<sup>TM</sup> High Fidelity system  
Biochemica Information, 101, 32-35, 1997

**Ried, Heselmeyer-Haddad, Biegen, Schröck, Auer**

Genomic Changes Defining the Genesis, Progression, and Malignancy Potential in Solid Tumors: A Phenotype/Genotype Correlation  
Genes Chromosomes and Cancer 25: 195-204, 1999

**Savelieva, Belair, Newton, deVries, Gray, Waldman, Reznikoff**

20q gain associates with immortalization: 20q13.2 amplification correlates with genome instability in human papillomavirus 16 E7 transformed human uroepithelial cells.  
Oncogene, Feb 6;14(5):551-60, 1997

**Schneider, Dürst, Gissmann**

Epidemiologie, Ätiologie, und Prävention des Zervixkarzinoms  
Onkologie, 4, 110-123, 1998

**Schröck, du Manoir, Veldman, Schöll, Wienberg, Ferguson Smith, Ning, Ledbetter, Bar, Soenksen, Garini, Ried**

Multicolour spectral karyotyping of human chromosomes  
Science, 273, 494-497, 1996

**Schröck, Padilla-Nash**

Spectral karyotyping and multicolor fluorescence in situ hybridization reveal new tumor-specific chromosomal aberrations  
Seminars in hematology, 37, 334-347, 2000

---

**Schuffenhauer, Murken**

Moderne chromosomale Untersuchungstechniken

Der Kinderarzt, 28, 8, 1997

---

**Seagon, Dürst**

Genetic Analysis of an in-Vitro model system for human papillomavirus type 16-associated tumorigenesis

Cancer Research, 54, 5593-5598, 1994

---

**Serrano**

The tumor suppressor protein p16INK4A

Exp. Cell Research, 25, 237(1) 7-13, 1997

---

**Sherwood, Shivapurkar, Lin, Ashfaq, Miller, Gazdar, Muller**

Chromosome 4 Deletions are frequent in invasive cervical Cancer and differ between histologic variants

Gynecologic Oncology 79, 90-96, 2000

---

**Singh, Gogineni, Sacks, Shaha, Shah, Stoffel, Rao**

Molecular cytogenetic characterization of head and neck squamous cell carcinoma and refinement of 3q amplification

Cancer Research, 61, 4506-4513, 2001

---

**Solinas-Toldo, Dürst, Lichter**

Specific Chromosomal Imbalances in Human Papillomavirus-Transfected Cells During Progression Toward Immortality

Genetics, 94, 3854-3859, 1997

---

**Speicher, Ballar, Ward**

Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH

Nature Genetics 12, 368-375, 1996

---

**Squire, Bayani, Luk, Unwin, Tokunaga, MacMillan, Irish, Brown, Gullane, Kamel-Reid**

Molecular cytogenetic analysis of head and neck squamous cell carcinoma: By comparative genomic hybridization, spectral karyotyping, and expression array analysis

Head Neck, Sep;24(9):874-87, 2002

---

**Szuhai, Bezrookove, Wiegant, Vroloijk, Dirks, Rosenberg, Raap, Tanke**

Simultaneous Molecular Karyotyping and Mapping of Viral DNA integration Sites by 25-Color COBRA-FISH

Genes, Chromosomes and Cancer 28:92-97 (2000)

---

**Tanaka, Horikawa, Barrett, Oshimura**

Evidence for inactivation of distinct telomerase repressor genes in different types of human cancers

International Journal of Cancer, 115, 653-657, 2005

---

**Tanke Wiegant, van Gijlswijk, Bezrookove, Pattenier, Heetebrij, Talman, Raap, Vrolijk**

New strategy for multi-colour fluorescence in situ hybridisation: COBRA- Combined Binary, ratio labelling

European Journal of human genetics, 7, 2-11, 1999

---

---

**Thorland, Myers, Persing, Sarkar, McGovern, Gostout, Smith**

Human papillomavirus type 16 integrations in cervical tumors frequently occur in common fragile sites

Cancer Research, 60, 5916-5921, 2000

---

**Tsien, Fiala, Youn, Long, Laird, Weissbecker, Ehrlich**

Prolonged culture of normal chorionic villus cells yields ICF syndrome-like chromatin decondensation and rearrangements

Cytogenetic Genome Research 98, 13-21, 2002

---

**Veldman, Vignon, Schröck, Rowley, Ried**

Hidden chromosome abnormalities in haematological malignancies detected by multicolour spectral karyotyping

Nature Genetics, Apr;15(4):406-10, 1997

---

**Walter, Schermelleh, Cremer. Tashiro, Cremer**

Chromosome order in HeLa cells changes during mitosis and early G1, but is stably maintained during subsequent interphase stages

Journal of cell biology, 160, 5, 685-697, 2003

---

**Wentzensen, Vinokurova, von Knebel Döberitz**

Systematic review of genomic integration sites of human papillomavirus genomes in epithelial dysplasia and invasive cancer of the female lower genital tract

Cancer Research 64, 3878, 2004

---

**Wollscheid, Kühne-Heid, Stein, Jansen, Köllner, Schneider, Dürst**

Identification of a new proliferation-associated protein NET-1/C4.8 characteristic for a subset of high-grade cervical intraepithelial neoplasia and cervical carcinomas

International Journal of Cancer, 99, 771-775, 2002

---

**Zhang, Zheng, Lindvall, Hou, Ekedahl, Lewenson, Yan, Yang, Henriksson, Nordensköld, Zetterberg, Björkholm, Gruber, Xu,**

Frequent Amplification of the telomerase reverse transcriptase gene in human tumors

Cancer Research 60, 6230-6235, 2000

---

**Zitzelsberger, Szücs, Weier, Lehmann, Braselmann, Enders Schilling, Breul, Höfler, Bauchinger**

Numerical abnormalities of chromosome 7 in human prostate cancer detected by Fluorescence-in-situ-Hybridization (FISH) on paraffin-embedded tissue sections with centromere-specific DNA probes

Journal of Pathology, 172, 325-335, 1994

---

**zur Hausen**

Immortalization of human cells and their malignant conversion by high risk human papillomavirus genotypes

Seminars in Cancer biology, 9, 405-411, 1999

---

**zur Hausen**

Papillomavirus and Cancer: From basic studies to clinical application

Nature, 2, 342-350, 2002

---



## 6 Wichtige Abkürzungen

APC	adenomatous polyposis coli
CFS	common fragile site
CGH	comparative genomic hybridisation
CIN	cervical intraepithelial neoplasia
COBRA-FISH	combined binary ratio-labeled Fluorescence in-situ hybridisation
DAPI	4',6'-Diamino-2-phenyl-indol-dihydrochlorid
DCC	deleted in colon cancer
D-MEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
DNA	Desoxyribonucleic acid
DPC	deleted in pancreatic cancer
EDTA	Ethylendiamintetra acetic acid
EGF	epidermal growth factor
FCS	fetal calf serum
FISH	Fluorescence in-situ hybridisation
GP	general primer
HPK	human papillomavirus immortalized keratinocytes
HPV	human papillomavirus
hr	high risk
hTERT	human telomerase catalytic subunit
hTR	human telomerase RNA component
I-FISH	Interphase-FISH
ISH	in-situ hybridisation
LOH	loss of heterozygosity
M-FISH	multitplex-FISH
MMCT	microcell-mediated chromosome transfer
p	Passage (bezogen auf Populationsverdopplung)
PBS	phosphate buffered saline
PCC	premature condensed chromosome
PCR	polymerase chain reaction
PD	Population doubling
PTEN	phosphatase and tensin homolog
RNA	Ribonucleic acid
RT	Raumtemperatur

SKY	spectral karyotyping
SV-40	simian virus 40
UV	ultraviolet
YAC	yeast artificial chromosome

## **7 Danksagung**

Herrn Professor Dr. rer. nat. Matthias Dürst danke ich für die Betreuung und die kritische Auseinandersetzung mit der Arbeit und für die Ideen.

Herrn Prof. Dr. med. Uwe Claussen gilt mein Dank für die Vertretung dieser Arbeit an der Fakultät und für die hilfreiche, anregende Kritik,

Ohne Frau Dr. rer. nat. Claudia Backsch und ihren unermüdlichen Optimismus, die Überzeugung und die viele Zeit, die sie für die Korrektur und die Diskussion für die Karyogramme aufgewendet hat, wäre ich sicher nicht so weit gekommen.

Frau Dr. med. Kühne-Heid danke ich dafür, dass sie mit mir vor dem Mikroskop gesessen, mir die Fälle für die Interphasen-FISH herausgesucht und mir nebenbei die Morphologie und Pathologie erläutert hat. Auch Susanne Köllner hat mir stets geholfen.

Ich bin Frau Professor Dr. med. Evelin Schröck zu Dank verpflichtet für die Bereitschaft zur Kooperation, die Hilfen und Tipps.

Und auch bei Frau B.Sc. Karen Stout-Wieder und Dipl-Biol Ulrike Montag aus der Arbeitsgruppe Tumorgenetik, ehemals in der Charité Berlin, möchte ich mich bedanken für die für die Einführung in die SKY-FISH, viele Hilfestellungen und die Unterstützung während meiner Aufenthalte in Berlin, ich habe mich dort immer sehr wohl gefühlt.

PD Dr. med Oliver Bartsch danke ich für seine Hilfen mit der I-FISH und der Sondenherstellung.

Ein großes Dankeschön der gesamten klinischen Forschergruppe Gynäkologische Molekularbiologie, besonders Katrin Beer und Dipl.-Biol. Susanne Grube für die Hilfe in der Zellkultur, Lars Jansen und Dipl.-Biochem. Bettina Rudolph für die Diskussion des Themas.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern, meiner Schwester Petra und Fagus Pauly für die Unterstützung.

**Selbständigkeitserklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich diese Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt habe.

Jena, im Januar 2006

**Ehrenwörtliche Erklärung**

Ich erkläre hiermit, dass

- mir die geltende Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist,
- ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben habe,
- ich alle Personen, die mich bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben, namentlich genannt habe,
- ich die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen habe und Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,
- ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe.

Jena, den 15. Januar 2006

---

## Lebenslauf

Birgit Meyer

geboren am 13.12.1975 in Cuxhaven

1988-1995	Gymnasium Otterndorf  1995: Abitur
1995-2001	Studium an der Carl-von Ossietzky-Universität Oldenburg  Biologie  Hauptfächer: Mikrobiologie, Biochemie, Genetik
September-Dezember 1999	Auslandsaufenthalt Universität Kalmar (Schweden)  Mikrobiologie
2001	Diplom  Diplomarbeit  Etablierung der Interphasen-FISH an Schnitten paraffineingebetteter Zervixkarzinome zur Eingrenzung eines möglichen Seneszenzgenlocus auf 10p14-15  (angefertigt im Labor für Gynäkologische Molekularbiologie der Frauenklinik, Klinikum der Friedrich-Schiller-Universität Jena)
Oktober 2001- September 2004	Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Labor für Gynäkologische Molekularbiologie der Frauenklinik, Klinikum der Friedrich-Schiller-Universität Jena
2001-2005	Arbeiten zur vorliegenden Dissertation
Seit September 2005	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Friedrich-Löffler-Institut Jena

## Wissenschaftliche Veröffentlichungen

A region on human chromosome 4 (q35.1-->qter) induces senescence in cell hybrids and is involved in cervical carcinogenesis

Backsch, C., Rudolph, B., Kühne-Heid, R., Kalscheuer, V., Bartsch, O., Jansen, L., Beer, K., Meyer, B., Schneider, A., Dürst, M.  
Genes, Chromosomes and Cancer, 43, 260-272, 2005

## Poster

*Europäische Humangenetikkonferenz, 2004, München*

**Identification of two putative telomerase suppressor gene loci on chromosome 4 involved in cervical carcinogenesis**

Frank I, Rudolph B, Stanbridge E, Ullmann R, Erdogan F, **Meyer B**, Schneider A, Dürst M, Backsch C.

*14. Jahrestagung der Gesellschaft für Humangenetik, 2003, Marburg*

**Interphase FISH using YAC-derived probes reveals losses on 4q (4q32→4qter) in high grade lesions and in cervical cancer**

Backsch C, Rudolph B, **Meyer B**, Kühne-Heid R, Köllner S, Bartsch O, Kalscheuer V, Jansen L, Schneider A, Dürst M.  
Med Genetik 15/2003

**Molecular cytogenetic characterisation of human papillomavirus-transfected cell lines by spectral karyotyping**

**Meyer B**, Stout K, Trottier, F, Schröck E, Rudolph B, Schneider A, Dürst M, Backsch C.  
Med Genetik 15/2003

**Evaluation of the potential significance of a senescence gene locus on chromosome 4 involved in cervical carcinogenesis by LOH analyses**

Rudolph B, **Meyer B**, Kühne-Heid R, Bartsch O, Kalscheuer V, Beer K, Jansen L, Schneider A, Dürst M, Backsch C.  
Med Genetik 15/2003

*13. Jahrestagung der Gesellschaft für Humangenetik, 2002, Leipzig*

**Evaluation of the potential significance of a senescence gene locus on chromosome 4(4q31→4qtel) involved in cervical carcinogenesis**

Rudolph B, **Meyer B**, Kühne-Heid R, Bartsch O, Kalscheuer V, Beer K, Jansen L, Köllner S, Schneider A, Dürst M, Backsch C.  
Med Genetik 14/2002

**Interphase FISH using YAC-derived probes reveals losses on 10p14-15 in cervical cancer**

**Meyer B**, Kühne-Heid R, Bartsch O, Kalscheuer V, Köllner S, Rudolph B, Schneider A, Dürst M, Backsch C.  
Med Genetik 14/2002

*20. Internationale Papillomavirus-Konferenz, 2002, Paris*

**Evaluation of the potential significance of a senescence gene locus on chromosome 4 (4q31→4qtel) involved in cervical carcinogenesis**

Backsch C, Rudolph B, Meyer B, Kühne-Heid R, Bartsch O, Kalscheuer V, Beer K, Jansen L, Schneider A, Dürst M.

*10. Internationaler Humangentik-Kongreß, 2001, Wien*

**Identification of genetic alterations on chromosome 4 in the early phase of HPV-induced tumorprogression**

Backsch C, Wagenbach N, Rudolph B, Meyer B, Beer K, Stanbridge E, Schneider A, Dürst M

*19. Internationale Papillomavirus-Konferenz, 2001, Florianopolis*

**Identification of a putative senescence gene locus on chromosome 4 (4q31→4qtel) involved in cervical carcinogenesis**

Backsch C, Rudolph B, Beer K, Meyer B, Stanbridge E, Schneider A, Dürst M

*XVII. Akademische Tagung deutschsprechender Hochschullehrer in der Gynäkologie und Geburtshilfe, 2001, Salzburg*

**Identifizierung von genetischen Veränderungen während der humanen Papillomavirus (HPV)-bedingten Tumorentstehung**

Backsch C, Rudolph B, Beer K, Meyer B, Stanbridge E, Schneider A, Dürst M